

THESIS / THÈSE

MASTER IN BIOLOGY

Méthode de quantification d'OGM sur biochips

FLAMANT, Lionel

Award date:
2005

Awarding institution:
University of Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

MÉTHODE DE QUANTIFICATION D'OGM SUR BIOCHIPS

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Lionel FLAMANT
Juin 2005

Méthode de quantification d'OGM sur Biochips

FLAMANT Lionel

Résumé

La qualité des régimes alimentaires constitue une préoccupation essentielle dans notre société de consommation. Les diagnostics moléculaires peuvent jouer un rôle essentiel dans la sécurité alimentaire et ce, face aux aliments génétiquement modifiés.

La législation actuelle relative aux organismes génétiquement modifiés implique un étiquetage des produits dont la teneur en OGM dépasse le seuil des 0,9%. Il devient donc urgent de mettre au point des outils de biologie moléculaire permettant une détection rapide, sensible et spécifique, ainsi qu'une quantification des transgènes dans une matrice alimentaire. De nombreuses techniques qualitatives ont déjà été développées, mais peu d'entre elles sont actuellement capables de réaliser des mesures quantitatives. La PCR en temps réel et la PCR compétitive en sont les deux principaux acteurs.

La technologie des Biochips à ADN offre une nouvelle dimension dans les diagnostics moléculaires en permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre de gènes. De plus, l'automatisation des manipulations et les nouveaux outils de bioinformatique font des damiers à ADN une technologie robuste pour les diagnostics. Plusieurs approches de quantification, se basant sur la technologie des microdamiers à ADN associée à la technique de détection colorimétrique par précipitation à l'argent, sont actuellement développées au sein du laboratoire. Elles se basent sur l'utilisation de farines de référence et de standards internes.

Ce mémoire a eu pour objectif la mise au point d'une troisième approche. Il s'agit d'une PCR compétitive entre la plante et l'OGM, reprenant certains aspects de la PCR compétitive avec un standard interne, mais faisant également appel à la simplicité de mise au point de la méthode de quantification basée sur l'utilisation de farines de référence.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2005

Promoteur : J. Remacle

Nous voici arrivés au terme de ces quatre années d'études et il est temps de remercier quelques personnes ayant contribué de près ou de loin au bon déroulement de celles-ci.

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur José Remacle pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et accepté au sein de son équipe, ainsi que pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je voudrais aussi remercier mon tuteur Serge Leimanis pour m'avoir accompagné tout au long de ce mémoire, pour ses corrections et sa bonne humeur perpétuelle.

J'aimerais également remercier les membres de l'URBC, et plus particulièrement Babeth, Soumya, Jon&Jon, Gilles et Oli pour l'aide précieuse et les conseils qu'ils m'ont apportés, Andrée et Edouard pour leur disponibilité et leur patience et enfin Marc pour les réglages de nos fabuleux Macs.

Je n'oublie pas, bien entendu, mes cokotteurs et autres mémorants avec lesquels j'ai passé d'agréables moments. Merci à vous pour votre soutien et vos encouragements.

Merci à toi Marie-C. de m'avoir épaulé durant ces années d'études, d'avoir supporté mes angoisses les veilles d'examen et de m'avoir aidé à ne pas lâcher prise.

Merci à Rénald et Véronique pour les nombreuses corrections qu'ils ont gentiment acceptés d'apporter à ce manuscrit.

Je remercie finalement mes parents de m'avoir permis d'accomplir mes études dans les meilleures conditions possibles.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
AAT	Advanced Array Technology
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
bp	paire de base
°C	degré Celcius
C	Cytosine
CTAB	bromure d'hexadécyltriméthylammonium
CTL	contrôle
dNTP	déoxynucléotide triphosphate
dATP	déoxynucléotide adénine triphosphate
dCTP	déoxynucléotide cytosine triphosphate
dGTP	déoxynucléotide guanine triphosphate
dUTP	déoxynucléotide uracile triphosphate
EAT	Eppendorf Array Technologies
fmol	femtomole
g	accélération gravifique
g	gramme
G	Guanine
kb	kilobase
lec	lectine
log	logarithme
ln	logarithme népérien
M	molaire
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
mV	millivolt
ng	nanogramme
Nbr	nombre
nM	nanomolaire
nm	nanomètre
OGM	organisme génétiquement modifié
pb	paire de base
PBS	tampon salin de phosphate
PCR	polymerase chain reaction
rpm	rotation par minutes
RR	Roundup Ready
RRS	Roundup Ready Soybean
RT-PCR	real time PCR (PCR en temps reel)
s	seconde
SDS	dodécylsulfate de sodium
T	Thymine
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	température de fusion (Melting temperature)
U	Uracile
U	unité
UE	Union Européenne
UV	ultraviolet
µg	microgramme
µl	microlitre
µM	micromolaire

TABLE DES MATIÈRES

1^{ère} partie : INTRODUCTION

I. LES OGM	1
I.1. Introduction	1
I.2. Principe de ‘fabrication’ d’une plante transgénique	1
I.3. Pré-requis à la ‘fabrication’ d’un OGM	2
I.4. Les méthodes de transformation	2
I.4.a. Transformation génétique des plantes par <i>Agrobacterium</i>	2
I.4.b. Les méthodes de transfert direct d’ADN	3
I.5. Le cas du Soja transgénique Roundup Ready	5
I.6. OGM et divergences de positions	6
I.7. Législation actuelle vis-à-vis des Organismes Génétiquement Modifiés pour les Etats membres de l’Union Européenne	6
I.8. OGM et risques ?	8
II. METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES OGM	9
II.1. Introduction	9
II.2. Méthodes de détection basées sur les protéines	9
II.2.a. Les techniques Western Blot et ELISA	9
II.2.b. La technologie des ‘lateral flow strips’	10
II.3. Méthodes de détection basées sur L’ADN	10
II.3.a. Le Southern Blot	11
II.3.b. La PCR qualitative	11
II.3.c. Les PCR quantitatives	12
II.4. Les microdamiers à ADN adaptés à la détection et à la quantification d’un transgène	14
III. LES BIOCHIPS	15
III.1. Introduction	15
III.2. Classification des damiers suivant leurs applications	15
III.3. Principe d’hybridation de l’ADN cible sur damier	16
III.3.a. Notions de base d’hybridation sur support	16
III.3.b. Paramètres influençant l’hybridation	16
III.4. Elaboration d’un damier à ADN	18
III.4.a. Choix du support	18
III.4.b. Mode de fixation des ADN trappeurs	18
III.4.c. Mode d’adressage des ADN trappeurs	19
III.5. Méthodes de détection sur Biochips	19
IV. DETECTION ET QUANTIFICATION DES OGM SUR BIOCHIPS	21
IV.1. Introduction	21
IV.2. Quantification sur base de farine de référence	21
IV.3. Quantification par PCR compétitive avec un standard interne	22

2^{ème} partie : OBJECTIFS

OBJECTIFS	23
-----------	----

3^{ème} partie : MATÉRIEL ET MÉTHODES

<u>I. AMPLIFICATION D'ADN PAR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)</u>	<u>24</u>
<u>II. ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE</u>	<u>26</u>
<u>III. PURIFICATION DES PRODUITS PCR APRÈS MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE</u>	<u>27</u>
<u>IV. FIXATION DES ADN TRAPPEURS SUR LAMES FONCTIONNALISÉES</u>	<u>28</u>
<u>V. HYBRIDATION DES PRODUITS PCR BIOTINYLÉS SUR DAMIER ET RÉVÉLATION À L'AIDE DU SILVERQUANT DETECTION SYSTEM</u>	<u>29</u>
<u>VI. EXTRACTION D'ADN À PARTIR DE FARINE DE RÉFÉRENCE PAR LA MÉTHODE CTAB</u>	<u>31</u>
<u>VII. MICRO-ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE SUR SYSTÈME DNA 1000 LABCHIP</u>	<u>33</u>

4^{ème} partie : RÉSULTATS ET DISCUSSION

<u>I. MISE AU POINT DES PARAMETRES DE LA PCR COMPETITIVE QUANTITATIVE SELON L'APPROCHE ENVISAGEE PAR RUDI ET ASSOCIES</u>	<u>34</u>
I.1. Design des amorces	34
I.2. Réalisation d'un premier Test	36
I.3. Test de fonctionnalité des amorces 'Bipartites'	37
I.4. Test de fonctionnalité de l'amorce 'Head'	38
I.5. Optimisation des conditions de PCR	39
I.6. Test de fonctionnalité des enzymes exo1 et SAP	40
I.7. Test d'inactivation des enzymes exonucléase1 et phosphatase alcaline à la chaleur	41
<u>II. MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE APPROCHE DE PCR COMPETITIVE QUANTITATIVE</u>	<u>42</u>
II.1. Détermination de la concentration en amorce 'Bipartites'	43
II.2. Identification de la nature des bandes inattendues	44
<u>III. ELABORATION DE LA BIOCHIPS PERMETTANT LA DETECTION ET LA QUANTIFICATION DES TRANSGENES</u>	<u>44</u>
III.1. Imagination du 'design' de la Biochips	45
III.2. Premier essai d'hybridation sur damier	45
III.3. détermination des rapports nombre d'amplicons RR /nombre d'amplicons lectine	48
III.3.a. Electrophorèse sur gel d'agarose	49
III.3.b. Micro-électrophorèse capillaire	50
III.4. Etablissement d'une droite de calibration au moyen d'un plus grand nombre d'échantillons	50
III.5. Test de l'influence de la concentration en amorces 'Bipartites'	51
III.6. Etude de l'influence du nombre de cycles d'amplification PCR	52
III.7. Etude de l'influence de la quantité initiale d'ADN génomique dans la solution PCR	54
<u>IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	<u>56</u>

5^{ème} partie : BIBLIOGRAPHIE

1^{ère} partie : INTRODUCTION

I. LES OGM

I.1. INTRODUCTION

Un OGM est défini par la réglementation européenne comme ‘un organisme dont le matériel génétique a été modifié d’une manière qui ne s’effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle’ (art. 2 de la directive 2001/18). Généralement, le gène introduit par génie génétique est un gène ayant des propriétés intéressantes.

Le génie génétique correspond à l’ensemble des techniques permettant d’isoler un fragment d’ADN à partir d’un organisme pour l’introduire dans le génome d’une cellule d’un autre organisme et d’en modifier de cette façon le patrimoine héréditaire. Il permet ainsi de modifier, de supprimer ou d’introduire certains caractères dans une cellule. Les techniques de génie génétique peuvent être appliquées aussi bien sur des organismes animaux ou végétaux que sur des micro-organismes.

Les plantes génétiquement modifiées destinées à la culture et à l’alimentation ont été développées afin d’obtenir des propriétés telles :

- une résistance à une maladie ou un insecte
- une tolérance à un herbicide
- un profil nutritionnel différent
- une durée de stockage améliorée

I.2. PRINCIPE DE ‘FABRICATION’ D’UNE PLANTE TRANSGENIQUE

La transformation correspond à l’introduction stable d’une séquence nucléotidique étrangère dans le génome d’un organisme cible. Les gènes contenus dans cette séquence proviennent habituellement d’un autre organisme et ont généralement été modifiés. Ces constructions comprennent, entre autre, un promoteur permettant l’expression protéique dans la plante cible, le gène d’intérêt et un terminateur en fin de séquence codante. Cette succession promoteur-gène-terminateur est appelée cassette. En général, plusieurs cassettes différentes sont placées sur la construction utilisée pour la transformation de la plante (BATS, 2003)

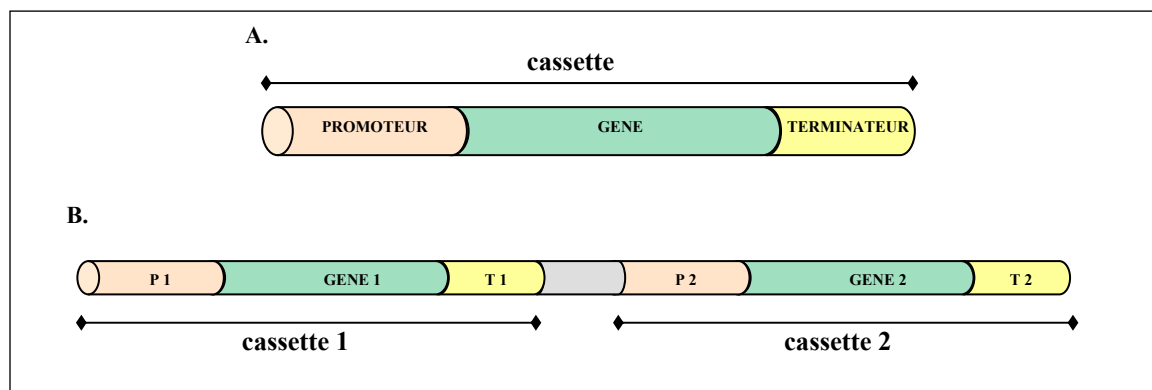


Figure I.1 A. Représentation simplifiée d’un insert typique contenant les trois composants nécessaires pour une intégration et une expression adéquate.
B. Présence de 2 cassettes sur une même construction

En plus des cassettes, d’autres éléments sont présents dans la construction et permettent par exemple la stabilisation du gène. Les principales étapes de la transgénèse végétale sont représentées à la Figure I.2. La fabrication d’une plante transgénique nécessite plusieurs étapes :

La première étape correspond à l'identification du caractère que l'on veut introduire dans la plante d'intérêt. Le gène codant ce caractère doit être isolé de l'organisme donneur et doit être intégré dans une construction génétique (plasmide ou vecteur). Celle-ci peut alors être introduite dans la bactérie *E. coli*. Un gène marqueur est utilisé pour ne sélectionner que les bactéries possédant ce plasmide et permet ainsi un clonage de la construction via la multiplication des bactéries.

L'étape suivante correspond à l'isolement des plasmides vecteurs et à la transformation des cellules végétales par une des techniques de transformation disponibles. Les cellules transformées sont mises en cultures et sélectionnées grâce à un second marqueur présent sur le plasmide. Les cellules transformées se développent initialement en cals, amas de cellules non différenciées. Des pousses sont obtenues après plusieurs semaines et une fois les racines développées, ces premières sont repiquées et placées en serre de culture. Les plantes régénérées sont ensuite soumises à des études d'expression génique pour confirmer l'insertion de la construction dans leur génome. Avant la commercialisation de l'OGM, tous les risques toxiques, alimentaires, écologiques, allergiques doivent également être évalués (Slater *et al.*, 2003).

I.3. PRE-REQUIS A LA 'FABRICATION' D'UN OGM

L'introduction et l'intégration stable des transgènes dans le génome de la plante hôte ne sont que les premières étapes dans la 'fabrication' d'un organisme génétiquement modifié. Le transgène doit être exprimé de manière appropriée dans le temps et au bon endroit. Les transcrits doivent être traités correctement et les protéines générées ciblées vers le bon compartiment cellulaire. Dans le but de combler ces pré-requis, des efforts de mise au point de la construction doivent être réalisés avant son introduction dans l'organisme cible.

Pour les cas simples comme celui du soja transgénique RR où un niveau élevé et non régulé d'expression protéique est recherché, le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur peut être utilisé. Cependant, lorsque cette même expression doit être régulée ou ne doit se dérouler que dans certains tissus seulement, d'autres promoteurs doivent être envisagés. Des séquences contrôles peuvent également être utilisées pour diriger l'expression du transgène. Ainsi, certaines de ces séquences permettent une régulation de l'expression génique par la lumière, par l'acide abscissique, ou dans certains tissus seulement.

Une fois traduites au bon endroit et dans les bonnes quantités, les protéines doivent généralement être dirigées vers un organite cible où elles pourront remplir leurs rôles. Il est donc souvent nécessaire d'ajouter à la séquence nucléotidique du transgène une séquence codant pour un peptide signal (Slater *et al.*, 2003).

I.4. LES METHODES DE TRANSFORMATION

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour permettre l'introduction efficace d'un transgène dans le génome de l'organisme cible. Plusieurs d'entre elles se basent sur l'utilisation d'une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*. D'autres se basent, quant à elles, sur l'emploi d'agents physiques ou chimiques ou sur l'utilisation d'un canon à microbilles pour introduire de manière plus directe l'ADN à l'intérieur des cellules.

I.4.a. Transformation génétique des plantes par *Agrobacterium*

La transformation médiée par la bactérie Gram négative *Agrobacterium tumefaciens* est la méthode la plus utilisée pour l'introduction de gènes étrangers dans les plantes. Elle est utilisée dans 64% des cas selon Wolfram (Wolfram, 1997). *A. tumefaciens* infecte

naturellement les dicotylédones via leurs blessures et induit la formation de tumeurs (apparition de galles ou d'un chevelu racinaire). En effet, cette bactérie possède la capacité de transférer un segment particulier d'ADN (T-DNA) du plasmide inducteur de tumeurs (Ti plasmid) dans le noyau des cellules infectées (Figure I.3). Ce segment peut alors être intégré de manière stable dans le génome de l'hôte. Le fragment T-DNA intégré encode les enzymes impliquées dans la synthèse des hormones végétales auxine et cytokinines impliquées dans la formation de la tumeur. Il contient également des gènes codant pour des protéines de synthèse des opines (des métabolites utilisés par *Agrobacterium* comme source de carbone et d'azote). L'attachement initial d'*Agrobacterium* à la cellule végétale est sous le contrôle de gènes chromosomiques de la bactérie. Des composés phénoliques produits par les cellules végétales blessées induisent en effet, sur le plasmide Ti, l'expression des gènes de virulence (vir) impliqués dans le processus de transfert (de la Riva *et al.*, 1998).

Les caractéristiques particulières qu'elle possède font de cette bactérie un outil particulièrement intéressant pour la transformation contrôlée d'espèces végétales. En effet plusieurs stratégies ont été mises au point pour permettre l'introduction de gènes d'intérêts dans la région T-DNA et pour supprimer l'effet oncogénique de la bactérie tout en conservant sa capacité de transformation. Ces stratégies impliquent deux approches différentes : l'introduction du gène d'intérêt par des méthodes indirectes dans le plasmide Ti, ou l'utilisation d'un système de vecteurs binaires (T-DNA binary vectors) dans lequel un des plasmides contient les gènes de virulence et l'autre la région ADN-T où sera cloné le gène d'intérêt. Le fait que le plasmide Ti soit relativement grand (entre 100 et 200 kb), et donc assez difficilement manipulable, rend la stratégie des vecteurs binaires plus adéquate (Gelvin *et al.*, 2003).

Cependant, si les plantes de type dicotylédones sont facilement transformables, d'autres souches végétales telles que les céréales sont moins propices à une telle transformation et nécessitent l'utilisation d'un tout autre système de transformation.

I.4.b. Les méthodes de transfert direct d'ADN

Parallèlement au développement des techniques de transformation par *Agrobacterium*, d'autres stratégies de transformation ont été envisagées et ont pour but de transférer directement, sans intermédiaire bactérien, des gènes dans les cellules végétales. C'est par transfert direct que les premières monocotylédones transgéniques (le maïs, le blé, le riz, le coton et le soja, par exemple, font partie des monocotylédones) ont été obtenues. Ces stratégies comprennent entre autre la biolistique, l'utilisation de polyéthylène glycol et l'électroporation.

L'électroporation est une des techniques les plus simples à mettre en œuvre et peut être appliquée aussi bien pour les dicotylédones que pour les monocotylédones. Elle consiste à soumettre un mélange de protoplastes et d'ADN à des chocs électriques. Les protoplastes sont des cellules végétales débarrassées de leur paroi pectocellulosique par des traitements enzymatiques faisant appel à des cellulases, des hémicellulases, etc. Ces cellules sont incubées dans une solution contenant le transgène sous forme de plasmide nu et sont soumises à un champ électrique pulsé. Celui-ci provoque la déstabilisation de la membrane plasmique et induit la formation de "pores" à travers lesquels l'ADN peut transiter (Figure I.4). Ce phénomène est réversible si le choc électrique n'a pas été trop violent, et la membrane peut alors reprendre son état initial. C'est par cette technique que le riz, le maïs ou l'orge ont été transformés pour la première fois (Fromm *et al.*, 1985).

La transformation chimique au polyéthylène glycol est une autre stratégie visant au transfert direct d'ADN à l'intérieur de protoplastes. En présence de cations divalents, généralement Ca^{++} , le polyéthylène glycol déstabilise la membrane plasmique du protoplaste

et la rend perméable à l'ADN nu. Une fois à l'intérieur de la cellule, cet ADN peut gagner le noyau et être intégré dans le génome cellulaire.

La biolistique, ou transformation par bombardement de particules, utilise des microbilles de tungstène ou d'or d'une taille de 1 micron enrobées d'ADN. Ces particules sont projetées à grande vitesse à travers la paroi pectocellulosique des cellules à transformer, sans pour autant leur infliger de dommages irréparables (Figure I.5). L'ADN est relâché dans la cellule et peut s'intégrer dans le génome. Cette méthode est très prometteuse, car elle permet de façon simple et rapide d'injecter de l'ADN dans une grande quantité de cellules sans passer par une phase protoplastique. En effet, malgré l'obtention aisée de protoplastes pour une vaste gamme d'espèces végétales, la régénération de plantes fertiles à partir des protoplastes n'est pas chose facile, et pose problème pour certaines d'entre elles. Dans le cas de la biolistique, l'introduction du gène d'intérêt peut être réalisée sur un tissu non désolidarisé de l'organe d'origine. On peut ainsi concevoir la transformation *in situ* de cellules méristématiques ou embryonnaires. Après développement de l'organe traité, on obtiendra une plante mosaïque constituée de cellules transformées et non transformées. Si certaines cellules à l'origine de la lignée germinale ont été transformées, cette plante chimère donnera dans sa descendance des graines aux embryons entièrement transformés. La méthode reste longue et très délicate, mais a prouvé sa faisabilité comme l'atteste le succès d'expériences réalisées sur de nombreuses espèces, parmi lesquelles le soja, le coton et diverses céréales. Il faut cependant faire un compromis entre le nombre et la taille des particules, et donc entre les dommages créés aux cellules, et la quantité d'ADN y pénétrant. Si une trop faible quantité d'ADN mène à une faible efficacité de transformation, une quantité trop importante peut conduire à des réarrangements génétiques des transgènes. Cela peut donner lieu à des fragments portant de multiples copies du transgène qui une fois intégrés seront à l'origine de 'hotspot' pour de futures intégrations. Ces réarrangements peuvent également conduire à des phénomènes de 'gene silencing' (Slater *et al.*, 2003).

Plusieurs autres stratégies ont également été développées pour la transformation de cellules : la lipo-transfection consistant à encapsuler le gène d'intérêt dans un liposome capable de fusionner avec la membrane du protoplaste, l'injection directe du transgène à l'aide d'une micro-aiguille, ou encore l'agrolistique qui est une combinaison de la biolistique et de la transformation par *A. tumefaciens*. Dans cette approche, les microbilles sont utilisées pour provoquer des microblessures dans les cellules qui seront ensuite soumises aux agrobactéries possédant le gène à transférer. Ces blessures vont faciliter l'envahissement des tissus par les agrobactéries et le rendement de la transformation en sera augmenté (Hansen *et al.*, 1996).

Une large variété de techniques est donc disponible pour la transformation de cellules végétales. Ces techniques peuvent être classées en deux catégories : les transformations médiées par *Agrobacterium tumefaciens* et les méthodes de transfert direct de gènes. La première de ces catégories est en général destinée aux souches végétales dicotylédones, tandis que les méthodes de transfert direct sont plutôt utilisées pour la transformation de monocotylédones tels que les céréales.

I.5. LE CAS DU SOJA TRANSGENIQUE ROUNDUP READY

Les premières cultures de soja ont vu le jour en Chine il y a 5000 ans. A cette époque, l'empereur avait appelé le soja "Ta Teou", ce qui signifie "grosse graine". Il le classa parmi les 5 plantes sacrées, les 4 autres étant le riz, le blé, l'orge et le millet. Le soja est une monocotylédone appartenant à la famille des légumineuses papilionacées. Il est une excellente source de protéines. L'huile de soja est riche en acides gras polyinsaturés et ne contient pas de cholestérol. Les graines de soja sont également riches en calcium, fer, zinc, phosphate, magnésium, vitamines B et folate et vu leur abondance, la biodisponibilité ne pose aucun problème. A l'heure actuelle, le soja est la culture protéagineuse la plus importante pour l'économie mondiale. Sa culture constitue une des trois plus importantes productions céréalières aux Etats-Unis (Figure I.6).

En 2004, on estime que la superficie mondiale cultivée avec des plantes transgéniques était de 81 millions d'hectares, contre 67,7 millions en 2003 (Figure I.7). En 2004, le soja biotechnologique a occupé 48,4 millions d'hectares, soit 60% de la superficie mondiale cultivée avec des variétés biotechnologiques (Figure I.8) (James *et al.*, 2004).

A l'aide des biotechnologies modernes, la firme Monsanto a développé les variétés de soja Roundup Ready (Roundup Ready Soybean (RRS)) possédant une capacité de résistance au glyphosate (l'ingrédient actif de l'herbicide agricole non sélectif Roundup, vendu par cette même firme). Cette capacité de résistance leur est conférée via la production d'une protéine particulière : la glyphosate-tolérant CP4 enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4 EPSPS). L'enzyme EPSPS intervient dans la voie de biosynthèse de certains acides aminés aromatiques chez les plantes et les microorganismes (Figure I.9).

Une inhibition de cette enzyme EPSPS par le glyphosate conduit à une déficience de production de ces acides aminés aromatiques et de cette manière à une diminution de la croissance des plantes. Le soja transgénique produit la protéine CP4 EPSPS naturellement moins sensible à une inhibition par le glyphosate. La séquence *CP4 EPSPS* provenant des souches communes de bactéries *Agrobacterium* a été intégrée dans le génome du soja par la technique de bombardement de particules (Monsanto, 2002).

Le soja Roundup Ready est particulièrement intéressant pour le contrôle de croissance des mauvaises herbes pouvant entrer en compétitivité avec cette plante pour la lumière, l'eau et les nutriments. Un problème de contrôle de ces mauvaises herbes dans les cultures peut conduire à une perte de qualité du soja et à des complications mécaniques pour la récolte.

Les sojas Roundup Ready ont été, pour la première fois, commercialisés en 1996 aux Etats-Unis, au Canada et en Argentine. Ils étaient alors présents dans moins de 5% des cultures de soja des Etats-Unis et sont passés à approximativement 71% en 2001. Pour cette même année, en Argentine, le soja RR remplace 95% des cultures traditionnelles de soja.

Une raison à l'adoption aussi rapide de cet OGM est la simplicité qu'il apporte sur le contrôle des mauvaises herbes. Puisque l'herbicide Roundup est efficace contre la majorité des mauvaises herbes annuelles et des plantes vivaces, les plantations de soja Roundup Ready permettent une réduction du nombre d'herbicides utilisés et un gain économique non négligeable. De plus, la diminution du nombre d'applications d'insecticides est favorable pour l'environnement.

Diverses études de toxicité potentielle ou d'allergie vis-à-vis du soja Roundup Ready ont été réalisées et ont, en résumé, démontré que la protéine CP4 EPSP ne représente pas de risque pour la sécurité alimentaire. Une évaluation agronomique a également été réalisée pour une détermination des risques écologiques vis-à-vis de cette souche génétiquement modifiée. Les résultats d'essais en champs réalisés depuis 1991 aux Etats-Unis, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud, en Europe et au Canada ont démontré que le soja Roundup Ready ne diffère pas du soja conventionnel tant dans sa morphologie que dans ses caractéristiques

agronomiques. Il a également été confirmé que le caractère de résistance au glyphosate a été intégré de manière stable. Aucun risque de dispersion du gène à d'autres plantes et aucun risque pour l'environnement n'ont été observés (Monsanto, 2002).

I.6. OGM ET DIVERGENCES DE POSITIONS

Les OGM sont devenus un sujet d'actualité quotidien : « OGM et éthique », « OGM et environnement », « OGM et communes », « OGM et alimentation », « OGM et étiquetage », etc. Le débat autour des OGM est d'ordre philosophique, écologique, politique, économique, juridique et de santé publique. Le recours aux technologies des plantes transgéniques est à l'origine de réelles divergences de positions dans le monde agricole et dans la société en général. Le papier écrit par Frewer et associés en 2004 tente de cerner les problèmes à la base des différences d'opinions vis-à-vis de l'acceptation ou du rejet des aliments génétiquement modifiés et des applications agricoles biotechnologiques. Il semblerait que les risques constituent un important facteur de préoccupation. Il a par ailleurs été conclu que l'incapacité passée des institutions à tenir compte des intérêts du public dans une partie de leurs activités s'est marquée par une perte de confiance (Frewer *et al.*, 2004).

La participation à des réunions publiques et autres conférences ou interviews, la rédaction d'articles consacrés aux OGM devraient avoir pour but de fournir au public l'information objective et loyale que celui-ci attend. Avec la nouvelle législation entrée en vigueur en 2004, l'Union Européenne répond en partie à la demande de transparence des consommateurs qui réclament leur « droit de savoir » et leur « droit de choisir ».

I.7. LEGISLATION ACTUELLE VIS-A-VIS DES ORGANISMES GENETIQUEMENT MODIFIES POUR LES ETATS MEMBRES DE L'UNION EUROPEENNE

La législation actuelle établie pour l'Union Européenne (UE) traite de différents aspects dont l'impact environnemental, la sécurité alimentaire, les procédures de commercialisation, ou encore l'étiquetage.

Le 22 juillet 2003, le conseil des ministres a formellement adopté 2 propositions de la Commission Européenne relatives aux organismes génétiquement modifiés, réglementant la mise sur le marché et l'étiquetage des denrées alimentaires et aliments pour animaux obtenus à partir d'OGM (Communiqué de presse du 23/07/2003 de l'Union Européenne) :

Notion de traçabilité (règlement 1830/2003)

Cette nouvelle législation vise à définir une approche fiable et respectueuse concernant les OGM, les denrées alimentaires et aliments génétiquement modifiés pour animaux. Il permettra d'assurer la traçabilité des OGM tout au long de la chaîne alimentaire et de fournir des informations au consommateur par l'étiquetage de toutes les denrées alimentaires et tous les aliments pour animaux composés ou obtenus à partir d'OGM, ou qui en contiennent. Dans le nouveau règlement, la traçabilité est assurée en obligeant les exploitants à transmettre et à conserver des informations à chaque étape de la mise sur le marché.

Etiquetage et seuil (règlement 1829/2003)

L'étiquette doit porter la mention: "Ce produit contient des organismes génétiquement modifiés" ou "produit à partir d'OGM (nom de l'organisme)". L'adoption de cette mesure a pour effet de permettre aux consommateurs d'exercer leur liberté de choix.

Des traces infimes d'OGM peuvent apparaître dans les aliments conventionnels destinés à la consommation humaine ou animale, durant la culture, la récolte, le transport et le traitement.

Qu'on le veuille ou non, les faits sont là. Dans la production d'aliments destinés à la consommation humaine ou animale et de semences, il est pratiquement impossible d'obtenir des produits purs à 100%. Dans un tel contexte, l'objectif de l'UE est d'établir certains seuils au-delà desquels les aliments doivent être étiquetés spécifiquement. Déjà obligatoire pour les produits contenant plus de 1% d'OGM, l'étiquetage devient nécessaire si l'aliment contient plus de 0,9% d'OGM. L'étiquetage a également été rendu obligatoire pour des aliments qui n'étaient auparavant pas concernés tels les huiles de soja et de maïs hautement raffinées. Pour les transgènes qui n'ont pas été approuvés par l'UE mais qui étaient déjà présents lors de l'ancienne législation, et qui ont obtenu un 'avis favorable' (évaluation favorable du risque) du ou des comités scientifiques de la Communauté, la teneur en OGM ne doit pas dépasser 0,5%. Les OGM qui n'ont pas été approuvés par l'UE et qui n'ont pas obtenu un avis scientifique favorable font l'objet d'une tolérance zéro.

Procédure d'acceptation d'un nouvel OGM (règlement 1829/2003)

L'évaluation scientifique des risques sera menée par l'Autorité Alimentaire Européenne. Son avis sera communiqué au public, lequel pourra formuler des observations. Sur la base de l'avis de l'Autorité Alimentaire Européenne, la Commission rédigera une proposition prévoyant d'accorder ou de refuser l'autorisation. Les produits autorisés sont inscrits dans un registre public des denrées alimentaires et des aliments génétiquement modifiés pour animaux. Une fois l'autorisation accordée, un plan de surveillance sera mis en œuvre. Les produits génétiquement modifiés actuels pourront encore être commercialisés. Toutefois, les opérateurs devront fournir des méthodes de détection dans les six mois qui suivent l'entrée en vigueur de la législation. Les produits génétiquement modifiés existants seront également inscrits au registre public et soumis au délai de 10 ans à compter de la première mise sur le marché du produit concerné.

Le 23 juillet 2003, la Commission a publié des recommandations visant à assurer la coexistence des cultures génétiquement modifiées et des cultures conventionnelles :

Les lignes directrices publiées par la Commission Européenne énoncent les principes généraux et les aspects techniques et de procédure qui auront pour but d'aider les états membres à concevoir des mesures réalisables pour garantir cette coexistence dans le respect de la législation communautaire. La coexistence est liée à la possibilité pour les agriculteurs d'offrir aux consommateurs le choix entre des produits traditionnels, biologiques ou génétiquement modifiés respectant les normes d'étiquetage et de pureté européennes. Elle ne concerne pas les risques pour l'environnement ou pour la santé puisque seules les cultures génétiquement modifiées qui ont été considérées comme sûres pour l'environnement et pour la santé humaine et qui ont été autorisées peuvent être cultivées dans l'UE. Étant donné l'absence de séparation naturelle entre les différentes filières de production agricole, il convient, lors de la culture, de la récolte, du transport, du stockage et de la transformation, de prendre des mesures adéquates afin de gérer le risque éventuel de mélange accidentel de cultures génétiquement modifiées avec d'autres cultures.

Actuellement, l'approbation et la mise sur le marché des OGM dépendent toujours du règlement n° 1829/2003 datant du 22 juillet 2003 et entré en vigueur en avril 2004. La Commission a publié le 18 avril 2005 une liste de 26 produits génétiquement modifiés qui étaient déjà légalement sur le marché européen avant l'entrée en vigueur du nouveau cadre législatif. Ces 'produits existants' déjà autorisés au titre de l'ancienne législation sont inscrits dans une section spécifique du registre communautaire des denrées alimentaires et aliments génétiquement modifiés. L'Union Européenne n'a jusqu'à présent autorisée que 2 types de

souches transgéniques tant pour la culture que pour l'utilisation alimentaire animale et humaine. Il s'agit des maïs transgéniques Bt11 et NK603.

I.8. OGM ET RISQUES ?

Comme pour toutes les nouvelles technologies, les modifications génétiques des plantes peuvent présenter des risques potentiels. Le transfert du gène d'intérêt dans un organisme extérieur tel qu'une souche végétale non transgénique ou dans un organisme procaryote est une source d'inquiétude chez les consommateurs. En effet, certaines plantes génétiquement modifiées contiennent en plus du gène d'intérêt un gène de résistance à un antibiotique. Ce dernier est utilisé comme marqueur permettant d'identifier les cellules dans lesquelles l'introduction du gène d'intérêt a réussi. Certains s'inquiètent de l'éventualité que ces gènes marqueurs passent de l'aliment transgénique aux bactéries de la flore intestinale provoquant ainsi une résistance accrue aux antibiotiques. Une autre crainte vis-à-vis des organismes transgéniques est qu'un allergène puisse être accidentellement introduit dans un produit issu de biotechnologies végétales. Cependant, ces risques ne sont que potentiels. Les aliments issus des plantes génétiquement modifiées sont de tous les aliments ceux qui subissent le plus de tests. En effet, avant d'être commercialisés, ces produits sont évalués conformément aux directives émises par la législation en vigueur. Pour qu'une culture ou qu'un aliment génétiquement modifié soit autorisé sur le marché, il doit faire l'objet de nombreux tests et son innocuité doit être contrôlée par des experts indépendants en nutrition, toxicologie, allergénicité, etc. Remarquons également que concernant la santé humaine, il n'existe à l'heure actuelle aucune culture génétiquement modifiée autorisée ni aucun aliment issu de telles cultures qui ait fait preuve de sa toxicité ou de son allergénicité (GM Science Review Panel, 2003).

Il existe également des risques potentiels environnementaux comme la possibilité que des gènes introduits soient transmis à des espèces sauvages apparentées. En effet, la principale crainte environnementale suscitée par les cultures transgéniques concerne leur capacité à générer de nouvelles mauvaises herbes par croisement avec des espèces sauvages apparentées. Cependant, l'éventualité que cela se produise est également évaluée avant la mise sur le marché des semences transgéniques. Une surveillance est par ailleurs mise en place une fois la plante autorisée à la culture. Notons qu'une étude sur dix ans initiée en 1990 a démontré qu'il n'existe pas plus de risques d'envahissement ou de persistance dans les habitats sauvages pour les cultures transgéniques que pour les cultures traditionnelles non modifiées. Malgré cela, comme l'exige la réglementation, chaque culture transgénique est étudiée au cas par cas avant sa commercialisation et continue de l'être par la suite (Global Knowledge Center on Crop Biotechnology, 2004).

II. METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES OGM

II.1. INTRODUCTION

La législation en vigueur concernant la régulation de la présence d'éléments modifiés génétiquement dans végétaux cultivés et dans les aliments nécessite le développement de méthodes sensibles et reproductibles pour la détection d'OGM. En effet, le fait d'avoir décrété de telles dispositions ne les rend pas effectives. Pour cela, il faut encore être en mesure d'en vérifier l'application correcte par des méthodes analytiques. Des efforts communs ont été fournis de la part des gouvernements, des laboratoires scientifiques, des industries alimentaires et des supermarchés pour distinguer les produits contenant du matériel transgénique des autres qui en sont exempts.

Actuellement, les stratégies mises au point se basent sur des analyses protéiques et d'ADN et emploient des techniques telles que le Western Blot, l'ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay), les 'lateral flow strips', le Southern Blot, les PCR qualitatives, quantitatives et en temps réel (Real-Time PCR), ou encore d'autres techniques plus récentes dont les microdamiers à ADN.

Des matières premières transgéniques comme les semences et les graines jusqu'aux produits finis tels que les aliments destinés à la consommation humaine ou animale, les éléments transgéniques doivent pouvoir être identifiés sur base de l'ADN introduit ou sur base des nouvelles protéines exprimées.

II.2. METHODES DE DETECTION BASEES SUR LES PROTEINES

II.2.a. Les techniques Western Blot et ELISA

Rogan et associés ont développé des méthodes immunologiques de reconnaissance de protéines issues d'aliments et spécifiques aux sojas Roundup Ready. Les techniques Western Blot et ELISA ont été adaptées pour la reconnaissance et la semi-quantification de la protéine 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (CP4 EPSPS) synthétisée par ces souches transgéniques (Rogan *et al.*, 1999).

Le Western Blot a été utilisé pour la caractérisation de la protéine CP4 EPSPS et pour une estimation de son niveau d'expression à partir de produits alimentaires (Figure II.10). Bien que, contrairement à l'ELISA, le Western Blot ne soit pas une technique à haut débit, ce dernier est à favoriser dans le cas où la protéine d'intérêt est difficile à extraire ou dans le cas où les caractéristiques physiques de cette protéine doivent être évaluées. L'ELISA est, quant à elle, la méthode de choix pour une quantification précise du niveau d'expression protéique dans les plantes génétiquement modifiées (Figure II.11). Il en existe différentes variantes : l'ELISA basique, l'ELISA compétitive et l'ELISA 'en sandwich'. Cette dernière est privilégiée lors du dosage d'un antigène.

Les résultats obtenus en Western Blot pour un échantillon test doivent être comparés à un contrôle à contenu certifié en OGM préparé et analysé en parallèle à l'échantillon test ; par exemple un échantillon à 1% en OGM. Ainsi, si le Western Blot ne permet pas une quantification précise de la protéine d'intérêt, il permet néanmoins de déterminer si un échantillon contient plus ou moins d'OGM que le contrôle. Dans le cas de l'ELISA, la mise au point d'une droite de calibration permet d'estimer la concentration en protéine CP4 EPSPS dans un échantillon donné. Les données recueillies démontrent que les sensibilités, précisions et spécificités obtenues avec les techniques d'ELISA et de Western Blot en font des techniques appropriées répondant aux normes établies par la Commission Européenne. En

effet, une limite de détection de 0,25% à 1% a été obtenue avec le Western Blot selon le type d'échantillons testés. L'ELISA possède une limite de détection relativement proche : de 0,5% à 1,4%.

En résumé, la protéine CP4 EPSPS présente dans les aliments contenant du soja transgénique peut être détectée relativement facilement par la technique du Western Blot, alors qu'une quantification assez précise peut être réalisée grâce à l'ELISA.

II.2.b. La technologie des 'lateral flow strips'

Les sensibilités et spécificités accrues de l'ELISA ont conduit au développement de la technologie des 'lateral flow strips'. Cette dernière consiste en un test qualitatif de la présence d'un antigène particulier dans un échantillon testé. Il s'agit d'une bandelette de nitrocellulose possédant une zone où sont retenus des antigènes spécifiques de la protéine d'intérêt et couplés à un composé coloré (Figure II.12). Lorsque la bandelette est mise en présence d'un extrait protéique contenant la protéine d'intérêt, cette dernière se lie au complexe anticorps-composé coloré. La porosité de la bandelette permet une migration par capillarité des nouveaux complexes formés. Ceux-ci arrivent alors au niveau de deux zones de capture, une première où sont fixés des anticorps spécifiques de l'antigène (la ligne test) et une seconde porteuse d'anticorps spécifiques au composé coloré (la ligne contrôle). De cette manière, la présence d'une seule ligne sur la bandelette indique que l'échantillon est négatif, alors que la présence de deux lignes indique un résultat positif (Ahmed *et al.*, 2002).

Cette technologie a été adaptée en 2001 par Fagan et associés pour la détection des sojas transgéniques. Les résultats obtenus alors montraient que si un échantillon possédant une teneur de 10% en OGM était détecté positif dans 100% des cas, il n'en était pas de même pour des échantillons à teneur inférieure. En effet, des fréquences de faux négatifs de 93, 70, 33 et 31% ont été obtenues pour des échantillons contenant respectivement 0,01 0,1 0,5 et 1% d'OGM. Le test n'était dès lors applicable qu'à la détection d'échantillons avec un haut niveau de matériel transgénique (Fagan *et al.*, 2001).

D'autres méthodes de détection se basant également sur l'utilisation d'anticorps ciblés contre une protéine spécifique d'un OGM ont été développées. Il existe, par exemple, des particules magnétiques porteuses d'anticorps de capture et qui permettent d'isoler, à l'aide d'un aimant, les protéines d'intérêts des autres protéines présentes dans un extrait protéique (Ahmed *et al.*, 2002).

Parmi ces différentes techniques, l'ELISA est la méthode à privilégier pour la détection d'OGM dans les matières premières, comme dans les produits finis, présents par exemple dans les supermarchés.

II.3. METHODES DE DETECTION BASEES SUR L'ADN

Il est évident que, comparées aux méthodes de détection basées sur les protéines, celles basées sur le transgène lui-même sont les plus universelles. Les protéines sont en effet fort sujettes à une dénaturation ou à une dégradation dès que l'aliment subit un processus de transformation comme la cuisson. L'ADN au contraire est une molécule assez robuste, même si par des ruptures de sa chaîne, elle finit également par se dégrader. De sorte qu'il apparaît qu'en ne cherchant que des segments d'assez petite taille (200 paires de bases et moins), il reste possible de déceler des segments de transgènes dans une matrice alimentaire ayant subi des transformations assez drastiques.

Les techniques immunologiques comme l'ELISA ou le Western Blot sont des méthodes bien moins sensibles que celles se basant sur une amplification PCR d'ADN. De plus, certains

organismes transgéniques n'expriment pas un niveau de protéines suffisant pour être détecté, et le recours aux méthodes basées sur la détection d'ADN devient nécessaire. Les méthodes de détection des protéines synthétisées ne permettent pas non plus de faire la distinction entre deux OGM différents exprimant la même protéine d'intérêt (Berben *et al.*, 2000).

Comme nous avons déjà pu le voir, l'ADN intégré dans un organisme lors des techniques de transgénèse végétale est typiquement composé d'une séquence promoteur, d'un gène d'intérêt et d'une séquence terminateur. Ces éléments vont pouvoir être utilisés pour la détection d'un transgène dans un échantillon donné. Plusieurs techniques sont disponibles, qui comprennent principalement le Southern Blot, l'amplification spécifique d'une séquence propre au transgène, et d'autres techniques plus récentes telles que les microdamiers à ADN et la spectrométrie proche infrarouge.

II.3.a. Le Southern Blot

Cette méthode consiste en la détection d'un fragment d'ADN dont on possède une sonde complémentaire. Il est donc possible de l'adapter à la détection qualitative de transgène dans une matrice alimentaire. Le principe général du Southern Blot est explicité à la Figure II.13. La fixation de l'ADN extrait d'un échantillon peut se réaliser sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon et la révélation peut se faire en radiographie, en fluorimétrie ou en chimioluminescence. Cette méthode relativement simple à mettre en œuvre est cependant considérablement moins sensible que les techniques impliquant une amplification de l'ADN par PCR. En outre, elle nécessite de plus une quantité assez importante de matériel génétique (Ahmed *et al.*, 2002).

II.3.b. La PCR qualitative

Nous venons de le voir, lorsqu'il s'agit de détecter et d'identifier des transgènes dans des aliments, une amplification génique est généralement nécessaire pour obtenir une bonne sensibilité. Cela implique qu'il faut d'abord extraire l'ADN contenu dans les aliments avant d'effectuer la réaction d'amplification génique d'une fraction de cet extrait. Le produit de la PCR peut alors être analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. La PCR consiste à amplifier, par voie enzymatique, le fragment d'ADN propre au transgène recherché. La détection est rendue possible grâce à l'effet multiplicateur de la réaction qui permet une mise en évidence sur gel du fragment d'ADN recherché, pour autant qu'il soit présent dans l'extrait. Il s'agit d'une technique puissante mais sujette à l'inhibition par certains composés, en particulier des polysaccharides et des polyphénols, ayant pu passer dans l'extrait d'ADN lors du processus d'extraction. Elle est également fort sensible à la contamination par des produits d'amplifications antérieures. Les deux principales étapes limitantes de cette technique PCR sont l'extraction et la purification de l'ADN. Actuellement, plusieurs méthodes d'extraction sont disponibles, les plus utilisées étant la méthode CTAB et la méthode de liaison de l'ADN à une résine de silice (kit Wizard). Elles permettent toutes deux d'obtenir un taux d'extraction satisfaisant en évitant une trop grande dégradation de l'ADN (Greiner *et al.*, 2004).

Le résultat de la PCR est conditionné par la nature des séquences oligonucléotidiques des amorces, puisque ces dernières définissent le fragment qui sera amplifié. Ce choix des amorces déterminera si l'analyse effectuée relève de la détection ou de l'identification. Lorsque les amorces se cantonnent au sein d'éléments fréquemment employés dans une construction transgénique, par exemple le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, on procède à une détection de criblage car la cible visée n'est pas typique d'une construction. L'analyse s'affine davantage lorsque les amorces se situent dans des éléments distincts mais voisins au sein de la région codante, puisqu'il s'agit alors d'une cible caractérisant la construction. Quant à l'identification de la lignée végétale transgénique, elle est possible en ciblant un segment d'ADN propre à l'événement de transformation. Il faut pour cela mettre au point des amorces s'hybridant sur la zone bordure des constructions, c'est-

à-dire des amorces s'hybridant à la fois sur l'ADN intégré et sur l'ADN de l'organisme hôte (Windel *et al.*, 2001).

Watanabe et associés ont développé cette technique pour la détection de huit souches transgéniques de pommes de terre autorisées au Japon. Une première paire d'amorces leur a servi à établir un test de criblage en amplifiant un gène présent dans les cinq souches de pommes de terre. Des autres paires d'amorces s'hybridant au niveau de la jonction ADN génomique et ADN intégré, chacune spécifique à un événement, leur ont permis de distinguer les différentes constructions entre elles. Une limite de détection d'approximativement 0,1% a été obtenue pour les différents transgènes testés. La sensibilité et la spécificité de la méthode ont été confirmées par une étude menée dans 6 laboratoires (Watanabe *et al.*, 2004).

II.3.c. Les PCR quantitatives

Comme nous l'avons déjà vu, des traces infimes d'OGM peuvent apparaître dans les denrées alimentaires durant la culture, la récolte, le transport et le traitement. Dans la production de semences et d'aliments destinés à la consommation humaine ou animale, il est pratiquement impossible d'obtenir des produits purs à 100%. Les méthodes de PCR qualitatives ne permettent pas de distinguer un produit contenant des modifications génétiques d'un autre contaminé non-intentionnellement avec du matériel transgénique. Il est donc impératif de disposer de méthodes capables de chiffrer, en routine, la teneur en ADN transgénique dans une matrice alimentaire pour avoir si l'on se trouve en dessous ou au-dessus du seuil. Dans ce but, deux méthodes basées sur la PCR peuvent être employées : la PCR compétitive et la Real-Time PCR.

La Real-Time PCR La PCR quantitative en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique. Cependant, elle permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le but est d'obtenir un marquage fluorescent du produit de PCR ; un fluorochrome est donc ajouté à la solution PCR. La réaction de PCR et la détection du produit de PCR sont donc simultanées. La Figure II.14 présente le principe de la PCR quantitative en temps réel avec utilisation d'une sonde TaqMan. L'appareil de RT-PCR n'est autre qu'un 'thermocycler' classique sur lequel vient s'ajouter un détecteur de fluorescence. L'appareil mesure l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. La quantité initiale d'ADN dans l'échantillon testé peut alors être déterminée en comparant la courbe reflétant la quantité de produit amplifié (autrement dit le signal fluorescent) en fonction du nombre de cycles à d'autres courbes obtenues avec du matériel dont la quantité d'ADN est connue (Figure II.15).

Pratiquement, pour chaque échantillon, l'émission de fluorescence enregistrée à la fin de chaque cycle de PCR permet de définir une valeur de Ct ('cycle threshold' ou cycle seuil) correspondant au nombre de cycles de PCR à partir duquel la valeur de l'intensité de fluorescence est significativement différente du bruit de fond. La valeur du Ct est d'autant plus faible que le nombre initial de copies de la séquence cible est grand. Elle est inversement proportionnelle au logarithme du nombre initial de copies de la séquence cible dans l'échantillon d'ADN (Provenzano *et al.*, 2001 ; Alary *et al.*, 2002). Le pourcentage d'OGM dans le matériel testé est alors établi en déterminant le rapport de la quantité initiale en un gène spécifique de l'OGM sur la quantité initiale en un gène propre à la plante. Il faut donc, pour chacune de ces séquences, dresser une courbe donnant la quantité initiale en ADN en fonction du Ct mesuré.

En 1999, Vařtilingom et associés ont adapté le principe de la PCR en temps réel à la quantification du maïs transgénique Maximizer et du soja transgénique Roundup Ready dans des aliments commercialisés. Leur idée était d'amplifier dans un unique tube PCR en même temps le gène spécifique à l'OGM et celui spécifique à la plante. Il s'agissait ensuite de

discriminer les amplicons via l'utilisation de deux fluorophores différents, l'un destiné au marquage de la séquence OGM et l'autre au marquage de la séquence plante (Vaitilingom *et al.*, 1999).

Outre les sondes TaqMan, il existe d'autres stratégies de détection de l'amplification en fluorescence. On peut citer l'utilisation des sondes Molecular Beacon et des sondes Sybr Green.

Pour la quantification des transgènes par la technique de la Real-Time PCR, de nombreux kits sont disponibles sur le marché. Applied Biosystems a, par exemple, commercialisé des kits de détection pour les maïs transgéniques Bt11, Bt176, MON810, des kits pour la détection du soja Roundup Ready et bien d'autres (Greiner *et al.*, 2005).

La PCR compétitive La PCR peut être utilisée comme méthode de détection quantitative grâce à certaines subtilités. Dans la PCR quantitative compétitive, le gène d'intérêt est co-amplifié avec un standard interne. Ce dernier correspond à une construction nucléotidique dont la séquence est quasiment identique à celle du gène d'intérêt, du moins en terme de contenu en G-C. Ce standard interne jouera le rôle d'ADN compétiteur. En effet, le standard interne et le gène d'intérêt vont tous deux être amplifiés avec les mêmes amorces et vont se comporter de la même manière durant la réaction d'amplification. Durant les premiers cycles de la PCR, l'efficacité d'amplification pour les deux séquences est identique, étant donné qu'elles sont amplifiées avec les mêmes amorces et qu'elles possèdent une homologie de séquence et de taille. Lorsque les amplicons s'accumulent, l'efficacité de copie diminue car il arrive un seuil où le nombre d'amplicons est tellement important que ceux-ci se réhybrident entre eux plutôt qu'avec les amorces. Cependant, les séquences de la cible et des standards étant proches, les amplifications s'arrêtent simultanément, ce qui explique la conservation des rapports après amplification (Figure II.16). Une mutation dans la séquence du gène d'intérêt afin d'introduire un site de reconnaissance pour une enzyme de restriction est un exemple permettant de mettre au point un standard interne. Il sera alors possible de faire la distinction sur gel entre les deux ADN compétiteurs. Après amplification, les produits obtenus seront soumis à une restriction enzymatique appropriée permettant de ne cliver par exemple que les amplicons du standard interne (Alexandre *et al.*, 1998). Sur base de ce principe, une approche permettant la détermination du pourcentage en OGM dans une matrice alimentaire a été développée. Il s'agit de la double PCR compétitive explicitée à la Figure II.17 (Holst-Jensen *et al.*, 2003). Une autre stratégie détaillée par la suite et qui est restreinte à la technologie des microdamiers à ADN est de modifier la séquence du gène d'intérêt au niveau de la zone de localisation du trappeur (cf paragraphe IV.3). Une telle technique possède l'avantage que la présence d'inhibiteurs de PCR n'influencera pas la quantification car les amplifications des deux types de séquences seront affectées de la même manière.

Dans la PCR multiplexe, plus d'une séquence cible peut être amplifiée en incluant dans la solution PCR plusieurs paires d'amorces (comme pour l'amplification simultanée d'une séquence OGM et d'une séquence plante dans le cas de la Real Time PCR ou de la double PCR compétitive). Théoriquement, il est possible d'amplifier autant de séquences que de paires d'amorces présentes dans la solution. En pratique, cependant, il n'en va pas de même. La présence de plus d'une paire d'amorces augmente la probabilité d'obtenir des produits d'amplification non attendus tels que des dimères d'amorces. Au plus le nombre de paires d'amorces est élevé, au plus l'optimisation de la PCR multiplexe devient hasardeuse. Il arrive souvent que certaines séquences soient amplifiées préférentiellement à d'autres, comme les dimères d'amorces, ce qui a pour but de consommer les composés de la solution nécessaires à l'amplification des autres séquences. Idéalement, au cours d'une PCR multiplexe quantitative, toutes les paires d'amorces devraient générer une même efficacité d'amplification de leurs séquences cibles. Cela n'est malheureusement que rarement le cas. Il faut alors tester empiriquement l'efficacité de différentes paires d'amorces jusqu'à trouver la combinaison

idéale. L'optimisation des PCR multiplexes présente de nombreuses difficultés qui paraissent proportionnelles au nombre de paires d'amorces mises en jeu (Elnifro *et al.*, 2000).

II.4. LES MICRODAMIERS A ADN ADAPTES A LA DETECTION ET A LA QUANTIFICATION D'UN TRANSGENE

Avec l'augmentation significative du nombre d'OGM développés pour des applications alimentaires, la capacité de détecter plusieurs transgènes lors d'une unique réaction devient une condition primordiale des moyens de détection. Récemment, la technologie des microdamiers à ADN ou Biochips a été proposée pour des applications d'analyse d'ADN dont la détection simultanée de plusieurs cibles. Le principe des Biochips sera explicité au chapitre III. L'idée générale est que des oligonucléotides simples brins fixés sur un support constituent des sondes dont le rôle est de capturer les cibles complémentaires marquées présentes dans l'échantillon à analyser. Tout comme pour les sondes fluorescentes Taqman utilisées dans la PCR en temps réel, les sondes trappeurs fixées au damier permettent de confirmer l'identité des séquences amplifiées. En effet, si une amplification non spécifique peut conduire à de faux positifs dans le cas de la PCR qualitative, une hybridation post PCR sur damier permet quant à elle de confirmer les résultats de PCR. Il faut par ailleurs noter que la sensibilité du microdamier à ADN est bien supérieure à celle d'un simple gel d'agarose.

Remarquons que si toutes les techniques impliquant la PCR permettent une détection sensible et spécifique des transgènes potentiellement présents dans une denrée alimentaire, il n'est pas possible de certifier l'absence d'OGM sur seule base de ces tests analytiques. En effet, les méthodes analytiques de détection ne parviennent à retrouver que ce qui est connu et la connaissance préalable des amorces à mettre en œuvre est essentielle à la réalisation de la PCR. L'idéal est de disposer d'informations relatives à la séquence de la construction transgénique ou, à défaut, relatives à certains détails de la construction (gènes ou éléments régulateurs introduits). Ceci ne signifie pas que les méthodes analytiques de détection et d'identification des OGM n'ont aucun intérêt. Elles constituent des moyens de vérification utiles puisque ce sont les OGM connus et autorisés qui sont les plus susceptibles d'être présents dans les aliments. Ce sont eux qui doivent dès lors faire l'objet d'un étiquetage. Remarquons de plus que le développement de méthodes d'extraction d'ADN efficaces constitue également un challenge, vu l'hétérogénéité des matrices alimentaires à analyser.

III. LES BIOCHIPS

III.1. INTRODUCTION

La technologie des puces à ADN ou biopuces connaît à l'heure actuelle un essor exceptionnel et suscite un formidable intérêt dans la communauté scientifique. Grâce à cette méthodologie, la détection simultanée d'un grand nombre de gènes est aujourd'hui techniquement possible. Les puces à ADN sont le fruit de technologies pluridisciplinaires telles que la micro-mécanique, la micro-optique, ou encore la micro-chimie. En effet, les damiers à ADN consistent en un support solide de l'ordre du centimètre carré sur lequel de nombreux fragments d'ADN, appelés 'ADN trappeurs' ou sondes de capture, sont fixés de façon géométrique.

Si la mise en œuvre de cette technique des puces à ADN est assez complexe, son principe en reste néanmoins simple. Il s'agit d'une version miniaturisée du Reverse Dot Blot : des mélanges d'ADN ou d'ARN isolés de sources biologiques sont marqués au moyen d'enzymes par incorporation de nucléotides porteurs d'un système rapporteur pour former des cibles. Celles-ci sont ensuite hybridées sur un support où sont immobilisées des sondes de capture pour conduire à la formation d'hétéroduplexes selon la règle d'appariement définie par Watson et Crick (Figure III.18). Des étapes de lavage permettent d'éliminer les interactions non spécifiques. La dernière étape consiste à révéler les hybrides formés. Un traitement informatique adéquat permet, quant à lui, d'obtenir l'intensité des signaux résultant de l'hybridation.

C'est ainsi qu'en un faible nombre d'étapes, il est possible de réaliser une étude de différents gènes, une recherche de mutations ou une étude d'expression de gènes.

III.2. CLASSIFICATION DES DAMIERS SUIVANT LEURS APPLICATIONS

Les damiers à ADN peuvent être divisés en deux classes selon le nombre de spots : les microarrays à faible densité possédant moins de 500 spots/cm² et les damiers à haute densité ayant plus de 500 spots/cm².

Les microarrays peuvent eux-mêmes être divisés en deux catégories selon le type de matériel analysé et selon le degré de quantification requis (Alexandre *et al.*, 2001).

Les chips à expression de gènes Celles-ci permettent une analyse semi quantitative des ARN messagers. Les ARNm obtenus à partir de cellules ou de tissus sont rétro-transcrits en populations d'ADNc marqués, qui sont hybridés sur damiers par la suite. Cette approche permet ainsi de déterminer la différence dans le profil d'expression de gènes entre deux situations différentes, par exemple entre un tissu normal et un tissu cancéreux ou entre des cellules tests et des cellules traitées avec une hormone (Burton *et al.*, 2003). En effet, le rapport des signaux d'hybridation mesurés pour les deux populations et pour un même ADN capteur indique s'il y a répression ou induction du gène qui correspond à la séquence capteur. Remarquons que l'hybridation des deux populations d'ADNc peut être réalisée en parallèle sur des damiers différents ou simultanément sur un unique damier dans le cas où les ADNc sont marqués différemment (Figure III.19).

Les damiers utilisés pour le diagnostic moléculaire Ceux-ci ont pour but de détecter la présence d'un organisme sur base de sa séquence en acides nucléiques. Pour cette seconde catégorie de damiers, le nombre de copies d'ADN dans les échantillons à tester étant généralement faible, il est souvent nécessaire, avant l'hybridation sur damier, de réaliser une amplification des ADN d'intérêt par une méthode telle que la PCR. Cela étant, le fait que

toutes les amplifications ne se réalisent pas avec une efficacité identique rend la quantification plus laborieuse. Concrètement, ces types de damiers permettent par exemple la détection de maladies génétiques (Snijders *et al.*, 2000), de maladies infectieuses (Godefroid *et al.*, 2000), l'identification d'antigènes tumoraux (MAGEchips) (Zammatteo *et al.*, 2002b), d'espèces bactériennes et déterminants de résistance aux antibiotiques (Staphychips) (Hamels *et al.*, 2001), d'espèces végétales et OGM (GMOchips) (Xu *et al.*, 2005), etc.

III.3. PRINCIPE D'HYBRIDATION DE L'ADN CIBLE SUR DAMIER

III.3.a. Notions de base d'hybridation sur support

La fixation des cibles d'ADN sur les ADN trappeurs liés au support repose sur l'hybridation mise en évidence par Watson et Crick. Pour rappel, un brin d'ADN est composé par la succession de quatre bases nucléotidiques : l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine (la guanine étant remplacée par l'uracile dans l'ARN). La double hélice bien connue est maintenue entière grâce à l'appariement par complémentarité des bases nucléotidiques de la séquence d'ADN. Cet appariement correspond à la formation de liaisons hydrogènes (ou ponts hydrogènes) entre les nucléotides A-T et C-G pour l'ADN et A-U et C-G dans le cas de l'ARN (Watson et Crick, 1953) (Figure III.20).

Selon le type d'étude réalisée, le matériel génétique est amplifié par PCR ou retro-transcrit en ADNc et marqué. L'ADN marqué ainsi obtenu est incorporé au mélange d'hybridation et mis en présence des ADN trappeurs simples brins du support. Une étape de dénaturation est cependant nécessaire pour séparer les deux brins complémentaires de l'ADN cible. Celle-ci peut se réaliser sous un pH alcalin, par la chaleur ou encore grâce à un détergent, et permet de rompre les ponts hydrogènes maintenant les deux brins d'ADN associés.

L'hybridation se déroule selon les deux étapes suivantes. Dans un premier temps, une étape de nucléation correspond à la rencontre au hasard des ADN simples brins des cibles et des sondes puis à l'association de quelques bases complémentaires. La seconde étape est la propagation dans les deux sens de cette zone de complémentarité, les deux brins vont se refermer telle une fermeture éclair (réaction de 'zippering') (Figure III.21). D'un point de vue thermodynamique, la première étape nécessite un apport d'énergie, généralement sous forme de chaleur, alors que l'étape de propagation correspond à une libération d'énergie. Une fois l'apport d'énergie libre nécessaire à la phase de nucléation réalisé, la variation d'énergie libre devient négative dans les étapes consécutives et l'hélice peut grandir spontanément (Wetmur *et al.*, 1991) (Figure III.22). Une correspondance parfaite entre les séquences nucléotidiques conduit à la formation d'une structure double brin très stable tandis qu'un ou plusieurs mésappariements déstabilisent cette structure. (Wolcott *et al.*, 1992). Autrement dit, plus l'homologie entre la sonde et la cible est importante, plus l'hybridation sera stable.

III.3.b. Paramètres influençant l'hybridation

Plusieurs paramètres peuvent influencer le taux de formation de duplexes durant l'hybridation. Les plus importants sont les suivants : les concentrations en cibles et en trappeurs, leurs séquences, la concentration en sels et la température.

Les concentrations en cibles et en trappeurs : Lorsque la concentration des trappeurs est plus de 10 fois supérieure à celle des cibles, une réaction cinétique de pseudo premier ordre se met en place. Le taux d'hybridation est à ce moment largement déterminé par la concentration en cible. Les conditions de pseudo premier ordre permettent de minimiser les

effets des différences mineures de concentration en ADN trappeur fixé sur la lame. Les stratégies efficaces de microdéposition et de fixation des sondes au support permettent la mise au point de microdamiers ayant une haute concentration en trappeurs et permettent ainsi d'assurer le maintien des conditions de pseudo premier ordre (Zammatteo *et al.*, 2002a).

La température d'hybridation : La température optimale d'hybridation correspondant à la vitesse maximale de la réaction d'hybridation est déterminée par la température de fusion ('melting temperature' T_m). Celle-ci est définie comme la température à laquelle 50% de l'ADN est désapparié et est fonction de la taille et du pourcentage en G-C de la séquence cible (Zammatteo *et al.*, 2000). A une température trop basse, la vitesse d'hybridation est pratiquement nulle car l'étape de nucléation nécessite, comme nous l'avons vu, un apport d'énergie, généralement sous forme de chaleur. Par contre, une trop haute température entraîne une déshybridation des brins complémentaires en rompant les ponts hydrogènes. Généralement, la température d'hybridation est choisie 15 à 25°C en dessous de la température de fusion de la sonde d'ADN (Remacle *et al.*, 1994). Remarquons qu'il est possible de faire varier ce paramètre pour modifier la spécificité d'hybridation, la formation d'hétéroduplexes étant plus difficile à haute température.

La concentration en sels : Les lavages et plus particulièrement la concentration en sels (NaCl le plus souvent) ainsi que l'usage de détergent influencent grandement les résultats de l'hybridation. Plus la concentration en sels est faible, plus la stringence des lavages est élevée. En effet, la présence de cations monovalents augmente le taux de formation d'hétéroduplexes en isolant les phosphates chargés négativement à pH neutre, et qui sont responsables de la répulsion entre les brins d'ADN (Zammatteo *et al.*, 2002a). Une faible concentration saline augmente donc la spécificité d'appariement.

La composition de la chaîne : La composition de la séquence est le paramètre sur lequel nous avons le moins de contrôle. L'appariement d'une cytosine avec une guanine induit la formation de 3 ponts hydrogènes, alors que seulement 2 sont générés dans le cas d'une adénine avec une thymine ou un uracile. La stabilité des duplexes est en conséquence plus élevée dans les régions riches en G-C. Les événements de nucléation conduisant à la formation d'hétéroduplexes seront donc favorisés par de telles régions. Remarquons, par ailleurs, que plus la sonde est riche en G-C, plus sa température de fusion est élevée et plus la température d'hybridation doit être élevée. En effet, comme le veut la règle, une association A-T supplémentaire augmente la T_m d'environ 2°C alors que celle-ci est augmentée d'approximativement 4°C pour un lien G-C supplémentaire (Southern *et al.*, 1999).

La taille des trappeurs : La taille de la sonde va agir sur la spécificité de la réaction, mais également sur la stabilité de l'hybride ainsi que sur la vitesse de la réaction d'hybridation. Une sonde courte s'hybride plus vite qu'une grande, mais étant donné son appariement moins stable, les conditions d'hybridation devront être moins stringentes, moins défavorables, et donc l'hybridation non spécifique sera plus importante (Remacle *et al.*, 1994).

Remarquons que les paramètres de concentration saline et de température d'hybridation doivent généralement être déterminés empiriquement pour un ensemble de conditions expérimentales données.

III.4. ELABORATION D'UN DAMIER A ADN

III.4.a. Choix du support

Depuis les premiers essais de développement des Biochips, de nombreux supports ont été testés, les premiers mis sur le marché étant les membranes de nitrocellulose et de nylon. Quel que soit le support, il doit présenter certaines caractéristiques telles qu'un faible taux de dispersion de la lumière, un bruit de fond négligeable, une stabilité chimique relativement importante et une grande capacité de fixation des sondes (Godefroid, 2000).

Actuellement, les deux principaux supports pour damier à ADN sont les membranes de nylon et les lames de verre. Les lames de verre pour microscope sont devenues le support standard principalement grâce à leur rigidité, leur transparence, leur faible bruit de fond et leur compatibilité avec un système de détection en fluorescence. De plus, comparé aux membranes poreuses, le verre offre l'avantage de ne pas laisser les liquides pénétrer la surface, offrant ainsi un accès direct des trappeurs pour les sondes, ce qui permet d'augmenter le taux d'hybridation (Zammatteo *et al.*, 2002a ; Southern *et al.*, 1999).

Notons qu'une fixation des ADN trappeurs sur un support plastique a également été étudiée par l'entreprise 'EAT' pour la mise au point de Bio-CD. Celui-ci correspond à un compact disc permettant la détection de séquences d'ADN dans un but de diagnostic. Les avantages du CD sont sa surface relativement importante qui permettrait de 'spotter' des milliers de sondes de capture différentes ou de tester plusieurs échantillons simultanément ; l'utilisation de l'information numérique gravée sur le CD permettrait la localisation et l'identification de chaque spot des damiers (Alexandre, 2002).

Des technologies encore plus audacieuses utilisant de micro-chips électroniques sont actuellement en cours de développement. Le support électronique utilisé serait comparable aux micro-puces présentes dans les ordinateurs (Foultier *et al.*, 2005).

III.4.b. Mode de fixation des ADN trappeurs

Une fois le support sélectionné, il est important que les sondes de capture y soient liées de manière stable. Plusieurs types d'approches peuvent être envisagées : des méthodes de couplage non covalent et des méthodes de couplage covalent.

Méthodes de couplage non covalent : Plusieurs techniques chimiques de liaison non covalente ont été envisagées pour lier l'ADN à la surface du support. Citons par exemple les interactions électrostatiques par la polylysine (Skena *et al.*, 1995) ou les interactions hydrophobes (Allemand *et al.*, 1997). Cependant, avec ces approches, les molécules d'ADN sont susceptibles de quitter la surface sous des conditions de forte salinité ou de hautes températures. De plus, avec ce type de couplage, l'ADN trappeur est immobilisé sur toute sa longueur, ce qui le rend moins accessible pour les ADN cibles. Les techniques de liaison covalente à la surface du support sont donc plus appropriées.

Méthodes de couplage covalent : Il existe une assez grande variété de réactions menant à la fixation covalente des sondes trappeurs sur le support. Ces supports peuvent être modifiés chimiquement pour y introduire des fonctions spécifiques tels que des groupements amines, époxydes, acides carboxyliques, ou aldéhydes, qui seront capables de se lier de manière covalente aux sondes pour les immobiliser. Cependant, comme dans le cas du couplage non covalent, la localisation et le nombre de sites de fixation ne peuvent être prédits. La longueur de la séquence nucléotidique intervenant dans l'hybridation varie de ce fait au cas par cas.

Une méthode alternative est de fixer les molécules d'ADN via leurs extrémités (Zammatteo *et al.*, 2002a). La méthode la plus courante est la formation d'un lien covalent imine entre une amine liée à l'extrémité de l'ADN et un aldéhyde en surface de la lame fonctionnalisée (Figure III.23). Ce lien imine sera par la suite réduit en lien amine plus stable grâce à un agent réducteur. Il existe néanmoins bien d'autres méthodes de fixation covalente des molécules d'ADN trappeur au support via leurs extrémités (Figure III.24) (Zammatteo *et al.*, 2000).

III.4.c. Mode d'adressage des ADN trappeurs

Deux types d'approches sont utilisées pour l'adressage des ADN trappeurs sur le support : la synthèse *in situ* et la fixation post-synthèse.

Synthèse *in situ* La méthode de synthèse *in situ* utilise la chimie combinatoire pour diriger la formation d'oligonucléotides sur le support. La méthode de déprotonation dirigée par la lumière, développée par Lipshutz et associés, est la stratégie la plus efficace pour générer des chips à très haute densité. Le procédé appelé photolithographie consiste à construire directement l'ADN capteur sur le support par dépôt de couches successives des quatre bases nucléotidiques (Figure III.25). Le support utilisé ici a été modifié pour porter des groupements aminés protégés par des groupements photolabiles. Lors de l'étape initiale du procédé, ce support est recouvert par un masque de forme définie ne laissant la lumière accessible qu'à certains sites. L'illumination entraîne une déprotection des groupes photolabiles exposés et les active de manière à ce qu'ils puissent réagir avec les premiers nucléotides ajoutés, eux-mêmes porteurs d'un groupement photolabile. Un nouveau masque photolithographique est placé à la sortie de la source lumineuse permettant de protéger d'autres sites, et ainsi de suite jusqu'à synthèse complète des ADN trappeurs (Lipshutz *et al.*, 1999). Cette méthode impose néanmoins une limite de 25 bases aux oligonucléotides synthétisés, ce qui justifie le développement des méthodes de dépôt post-synthèse (Zammatteo *et al.*, 2002a).

Dépôt post-synthèse Dans le cas présent, la synthèse des sondes est réalisée avant le greffage sur support. La technique de microdéposition génère les 'microarrays' par dépôt de faibles quantités d'ADN trappeurs à des endroits bien précis du support. Il n'y a pas de restriction à la taille des fragments 'spottés'. Deux techniques ont été développées. La première consiste en un dépôt mécanique de microgouttes à l'aide d'une aiguille. La seconde approche se base, quant à elle, sur une projection de microgouttes, un mécanisme comparable à celui des imprimantes à jet d'encre (Medlin *et al.*, 2001). Par rapport à la technique de synthèse *in situ*, les techniques de dépôt offrent également l'avantage de pouvoir préparer des damiers avec virtuellement toutes les molécules d'intérêt : acides nucléiques, anticorps, lipides, carbohydrates, etc. (Zammatteo *et al.*, 2002a).

III.5. METHODES DE DETECTION SUR BIOCHIPS

Les résultats d'hybridation sur microdamiers peuvent être révélés par différentes techniques de marquage telles que la fluorescence, la radioactivité ou la colorimétrie, chacune de ces approches nécessitant l'utilisation d'appareils de lecture particuliers.

La radioactivité Cette méthode de détection essentiellement utilisée pour la révélation sur membrane de nylon est de moins en moins utilisée, à cause sa nocivité ainsi que de l'usage de moins en moins fréquent de membranes de nylon.

La fluorescence L'utilisation de molécules fluorescentes est certainement la méthode standard de marquage des ADN cibles. Les stratégies de détection peuvent se regrouper en méthodes directes et en méthodes indirectes. Les méthodes indirectes utilisent habituellement de la streptavidine fixée à un fluorophore et qui se lie aux cibles biotinylées. Les méthodes directes se basent sur un marquage de l'ADN avec des nucléotides couplés à un fluorophore (Skena *et al.*, 1996) (Figure III.26). De nombreux fluorophores peuvent être utilisés tels que la cyanine3 ou la cyanine5. Cependant, le coût du matériel et des équipements confocaux restreint l'utilisation de ces méthodes au domaine de la recherche et les rend inappropriées pour des applications de routine (Zammatteo *et al.*, 2002a). De plus, les sondes subissent assez rapidement le phénomène de photo-décoloration et nécessitent des précautions particulières d'utilisation (Foultier, 2005).

La colorimétrie Des méthodes alternatives de révélation des résultats d'hybridation ont été développées. Des procédés de révélation en chimioluminescence ayant une sensibilité équivalente à la fluorescence ont été proposés (Rajeevan *et al.*, 1999). Cependant, ces méthodes ne sont pas applicables dans le cas de spots de faible taille à cause de la diffusion du signal. La détection en colorimétrie est également une alternative. Chen et collaborateurs ont proposé des moyens de détection basés sur l'utilisation d'une peroxydase ou d'une phosphatase alcaline (Chen *et al.*, 1998). Ces moyens sont néanmoins limités par leur faible sensibilité.

Une méthode colorimétrique basée sur un procédé non enzymatique a donc été développée par la société 'EAT'. Elle montre une sensibilité et une résolution équivalentes à celles obtenues en fluorescence. En effet, tout comme pour la fluorescence, la limite de détection est de 0,1 fmol de cible d'ADN biotinylée et hybridée sur damier. Le principe de cette méthode est expliqué à la Figure III.27. Les ADN cibles sont marqués à la biotine par incorporation de dATP et dCTP biotinylés lors de l'amplification par PCR. Après hybridation des cibles sur damier, des particules d'or complexées à de la streptavidine sont ajoutées et vont se lier à la biotine. Le signal des particules d'or est augmenté par une technique de précipitation à l'argent. Sous l'activité catalytique de l'or et grâce à l'utilisation d'une solution réductrice, les ions argent précipitent en argent métallique au niveau de l'or colloïdal (Alexandre *et al.*, 2001). Le signal de la particule d'or peut de cette manière augmenter considérablement car le diamètre de la particule d'or qui est de 20 nm peut donner lieu à un cristal d'argent de 1 μm (Figure III.28) (Foultier *et al.*, 2005).

Cette dernière méthode présente plusieurs avantages : il s'agit d'un procédé auto-catalytique de dépôt métallique dont la capacité d'amplification est supérieure à celle obtenue avec les méthodes enzymatiques, et le dépôt d'argent métallique reflétant la lumière dans le spectre visible permet l'utilisation d'un scanner colorimétrique plus simple d'utilisation et moins cher qu'un scanner confocal. De plus, le précipité d'argent est stable et permet une conservation des damiers pour de longues périodes. Cette méthode de détection peut aussi bien être appliquée pour des supports en verre comme pour des supports en plastique ou en polycarbonate (Zammatteo *et al.*, 2002a).

Remarquons que d'autres systèmes de détection se basant également sur l'utilisation de nanoparticules sont proposés pour la détection d'ADN, principalement sur support solide (Foultier *et al.*, 2005).

IV. DETECTION ET QUANTIFICATION DES OGM SUR BIOCHIPS

IV.1. INTRODUCTION

Un projet en cours de développement, ici à l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire et Moléculaire des Facultés Universitaires de Namur, a pour objectif la mise au point de Biochips permettant la détection des espèces végétales et des OGM qui pourraient y être associés et la détermination des teneurs en OGM. L'intérêt d'une telle Biochips est de permettre un 'screening quantitatif' par rapport à la valeur seuil établie de 0,9%.

Afin de pouvoir évaluer le pourcentage en OGM d'une matrice alimentaire, on envisage de faire le rapport entre l'intensité du signal (spot) spécifique de l'OGM et celui de l'espèce végétale dont est issu l'OGM. La teneur en OGM peut alors être déduite sur base de droites de calibration reproductibles mises au point préalablement.

Dans le cas du soja transgénique, une cible spécifique à l'espèce sera utilisée : la lectine. Les cibles transgéniques pour cet OGM correspondront à un élément spécifique de la construction transgénique ou de l'événement.

Deux problèmes sont à solutionner pour la quantification sur Biochips à partir d'ADN ayant été amplifié. D'abord, la quantification sur Biochips implique que l'intensité de coloration des spots soit en relation avec la quantité d'amplicons présents (Figure IV.29). Cela a pu être démontré sur Biochips en l'absence d'étape préalable d'amplification (Chen *et al.*, 1997). Les courbes d'amplification obtenues par PCR lors d'études menées par Sakaï et associés en 2002 montrent qu'avec des conditions de PCR adaptées, la quantification sur Biochips devrait être possible (Sakaï *et al.*, 2002). Le second problème est lié à la calibration. Il est indispensable de pouvoir comparer les intensités des spots obtenus à celles des spots de standards dont la quantité absolue (ou éventuellement relative) avant PCR était connue. Plusieurs modalités pour y arriver ont jusqu'à présent été envisagées, sur base de farines de référence à contenu certifié en OGM et à l'aide de standards internes ayant une séquence homologue à l'OGM à l'exception de la zone trappeur.

IV.2. QUANTIFICATION SUR BASE DE FARINE DE REFERENCE

Des farines de référence contenant de 0,1 à 5% en OGM permettent de dresser une courbe de calibration donnant le pourcentage en OGM en fonction du rapport signal-OGM/signal-soja (Figure IV.30). En effet, la Biochips comprendra les trappeurs destinés à la mesure d'un gène spécifique de l'OGM et d'un gène spécifique de la plante. Le pourcentage en OGM de l'échantillon inconnu sera calculé à partir de cette courbe de référence.

Il sera nécessaire de vérifier si la courbe de calibration est reproductible et peut donc être utilisée pour des essais différents, ou au contraire, si elle n'est pas reproductible et si elle doit être déterminée pour chaque nouvelle analyse. Il est également nécessaire de s'assurer que les 2 signaux OGM et plante ne soient pas saturés.

Li et associés ont cependant fait remarquer qu'une détection quantitative de gènes cibles n'est malheureusement pas réalisable avec une PCR conventionnelle telle que celle qui est envisagée, et cela à cause de la nature exponentielle de la PCR. En effet, de petites variations dans l'efficacité d'amplification conduiraient à d'importants bouleversements dans la quantité de produits finaux des différentes séquences cibles d'ADN. Ces problèmes pourraient être contournés par la mise en place d'une PCR compétitive (Li *et al.*, 2001).

IV.3. QUANTIFICATION PAR PCR COMPETITIVE AVEC UN STANDARD INTERNE

Une autre approche pour la quantification consiste à recourir à des standards plasmidiques possédant une séquence homologue à l'OGM, à l'exception de la zone trappeur, et permettant ainsi de réaliser une PCR compétitive. Comme dit précédemment, lors d'une PCR compétitive, la séquence d'intérêt et le standard interne qui en est dérivé sont amplifiés avec une efficacité identique, vu qu'ils sont amplifiés avec les mêmes amorces et qu'ils possèdent une homologie de séquence et de taille (Alexandre *et al.*, 1998 ; Ernest *et al.*, 2001).

Les standards plasmidiques auront la particularité d'avoir subi une modification de séquence au niveau de la zone de localisation du trappeur, ce qui permettra leur discrimination sur Biochips.

Il est dès lors possible de réaliser une courbe de standardisation avec une quantité constante de standard interne et différentes concentrations en OGM (Figure IV.31). Cette courbe de standardisation nous permettra sur base du rapport signal-OGM/signal-SI d'évaluer le nombre de copies initiales d'OGM. Un même exercice sera réalisé en parallèle pour le gène de la lectine. La comparaison du nombre de copies de lectine et d'OGM nous permettra de déterminer le pourcentage d'OGM présent dans l'échantillon étudié.

Ce modèle de quantification par PCR compétitive avec un standard interne peut être complexifié dans le but de réaliser toutes les hybridations sur un unique damier comprenant 5 trappeurs spécifiques à 5 standards homologues différents, d'une part pour la lectine, et d'autre part pour le RR (Figure IV.32). Bien que cette méthode puisse être la plus précise, elle reste la plus complexe à mettre en œuvre. De nombreux standards devraient être mis au point pour chaque OGM et il ne devrait pas y avoir de cross hybridation sur damier entre ces standards et avec les gènes spécifiques de la plante et de l'OGM.

2^{ème} partie : OBJECTIFS

L'objectif principal de ce mémoire est de développer une Biochips à ADN qui permettrait la détection d'un ou plusieurs organismes génétiquement modifiés dans une matrice alimentaire. Cette Biochips permettrait également la quantification de la teneur en transgène.

Outre les méthodes de quantification actuellement développées au sein du laboratoire et qui sont basées sur l'utilisation de farines de référence et de standards internes, une troisième approche peut être envisagée et fera l'objet de ce mémoire. Il s'agit d'une PCR compétitive entre la plante et l'OGM reprenant certains aspects de la PCR compétitive avec un standard interne, mais faisant également appel à la simplicité de mise au point de la méthode de quantification basée sur l'utilisation de farines de référence. L'idée générale repose sur la mise au point et l'utilisation d'amorces particulières appelées 'Bipartites'. Celles-ci sont ainsi dénommées car une partie de leur séquence s'hybride de manière spécifique sur le segment d'ADN à amplifier, alors qu'une autre partie 'universelle', toujours constante, est elle-même spécifique à une autre amorce, l'amorce 'universelle', ou 'Head'.

Théoriquement, un faible nombre de cycles PCR avec les amorces 'Bipartites' permettrait l'obtention d'amplicons pouvant, à leur tour être, amplifiés lors de cycles PCR successifs réalisés en présence de l'amorce Head (Figure 1). Plusieurs séquences, propres aux plantes et propres aux transgènes, peuvent dès lors être amplifiées avec cette unique amorce. Cette dernière caractéristique permet d'obtenir une compétitivité entre les séquences amplifiées pour les amorces 'Head'. On s'attend ainsi à ce que les efficacités d'amplification soient identiques pour les différentes séquences amplifiées et, de ce fait, à ce que la PCR soit quantitative. Différents extraits d'ADN issu de farines à teneurs diverses en OGM pourraient alors servir à tracer une courbe de calibration donnant le pourcentage en OGM en fonction du rapport des signaux OGM/plante mesurés sur le damier. Une mise au point des conditions de PCR sera nécessaire pour optimiser l'amplification spécifique des séquences d'intérêt.

L'étape ultérieure correspondra à l'hybridation des produits PCR sur Biochips et à la révélation des résultats par la méthode de précipitation à l'argent. Le recours aux Biochips est un choix judicieux pour la détection et l'analyse simultanées et spécifiques de multiples gènes ; il s'agit également d'une technique de biologie moléculaire simple, rapide et de relativement faible coût. La révélation colorimétrique par précipitation à l'argent se présente quant à elle comme une méthode de détection sensible, stable et également bon marché.

Afin de s'assurer de la faisabilité de cette méthode de quantification, nous nous sommes focalisés sur un OGM en particulier, le soja transgénique Roundup Ready développé par la firme Monsanto. La séquence propre à la plante sera une partie du gène de la lectine alors que la séquence spécifique au transgène sera une partie de la construction intégrée.

La première partie de ce travail consiste donc à mettre au point la PCR compétitive quantitative appliquée au cas particulier du soja transgénique Roundup Ready. La deuxième partie est, quant à elle, focalisée sur l'hybridation des produits PCR sur Biochips et sur la révélation des résultats par la méthode de précipitation à l'argent.

3^{ème} partie : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. AMPLIFICATION D'ADN PAR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Principe

Cette technique décrite en 1985 par Kary B. Mullis et collaborateurs permet d'accroître spécifiquement et de manière exponentielle une région d'ADN d'intérêt. Très rapidement, la PCR est devenue la méthode de choix pour l'amplification d'ADN. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent la portion d'ADN à amplifier. Ainsi, il sera possible de synthétiser des amorces oligonucléotidiques qui pourront aller s'hybrider spécifiquement au niveau de ces régions durant les cycles de PCR. Du point de vue pratique, cette technique est basée sur la répétition d'un processus en trois phases (Figure I.1) :

- une phase de dénaturation par la chaleur permettant une séparation des 2 brins d'ADN complémentaires,
- une seconde phase durant laquelle les amorces vont s'hybrider aux séquences qui leur sont complémentaires au niveau de l'ADN simple brin : la première amorce se fixe sur un brin d'ADN et la seconde sur le brin complémentaire,
- une phase d'extension enzymatique des amorces par une ADN polymérase thermostable qui synthétise un brin d'ADN complémentaire à celui servant de cible pour les amorces oligonucléotidiques. Ce processus peut être cyclisé grâce à l'utilisation d'une polymérase thermostable qui résiste à l'étape de dénaturation (Figure I.2).

Il en résulte une amplification de type exponentiel du fragment d'ADN bordé par les deux amorces. Chacune de ces différentes phases est caractérisée par une température en corrélation avec sa fonction.

Dans le but de minimiser un maximum les contaminations des solutions de PCR par un ADN génomique étranger, la préparation de ces solutions se réalise dans deux pièces indépendantes. Dans la pièce PCR1 est réalisé un mélange comportant tous les composés nécessaires à la réaction, à l'exception de l'ADN cible à amplifier. Celui-ci n'est ajouté au mélange qu'en pièce PCR2. Dans un même souci d'éviter les contaminations, il est conseillé de ne pas retourner en pièce PCR1 après être passé en pièce PCR2 ou après avoir manipulé de l'ADN. Dans ces 2 pièces, une lampe UV et un nettoyage des hottes avec une solution d'eau de Javel diluée permettent de détruire les éventuels ADN contaminants présents.

Deux types de PCR sont réalisés au cours de ce mémoire. Une première PCR a pour but d'amplifier le gène marqueur du soja ou le gène marqueur du soja transgénique et ses produits ont été déposés sur gel d'agarose dans le but de mettre au point les paramètres d'amplification. Le second type est la PCR biotinylée dont les produits ont été hybridés sur damiers. Les biotines incorporées dans les amplicons serviront ensuite lors de l'étape de révélation.

Remarquons que l'emploi d'UNG (Uracile DNA Glycosylase) dans la solution PCR permet également de réduire le risque de contamination. En effet, cette enzyme hydrolyse les liens déoxyuridiques présents dans les amplicons contenant de l'Uracile. Cette même enzyme est inactivée à 95°C lors de l'étape initiale de la PCR.

Matériel

- Eau stérile (H₂O)
- Nucléotides dNTPs 100mM (Roche Allemagne)
- Tampon 10x Taq Buffer (+MgCl₂ 15mM) (Eppendorf, Allemagne)
- Mg(OAc)₂ 25mM (Eppendorf, Allemagne)
- dATP biotinylés 1mM (Roche Allemagne)
- dCTP biotinylés 1mM (Roche Allemagne)

- Amorces PPHlec3, PPHlec4, PPHrr3, PPHrr4 et PPHead2 200µM (Eurogentec, Belgique)
- Taq DNA polymérase 5U/µl (Eppendorf, Allemagne)
- PCR reaction tube (Eppendorf, Allemagne)
- Thermocycler Eppendorf (Eppendorf, Allemagne)
- Hotte captair bio (Erlab, France)
- ADN génomique : extraits de farines à contenu certifié en OGM procurées par Sigma (Allemagne) et mise au point par IRMM (Belgique)

Protocole

Préparation de la solution PCR en pièce PCR1

Cette solution PCR contient les différents composants intervenant dans la réaction de polymérisation à l'exception de l'ADN génomique. Le volume de la solution sera adapté en fonction du nombre de tubes PCR à réaliser, chacun de ceux-ci contenant au final 50 µl après ajout de l'ADN génomique.

PCR normale :

Tampon Taq Buffer 1x
Mg(OAc)₂ 25mM (Eppendorf, Allemagne)
200 µM de dATP, dCTP, dGTP
400 µM de dUTP
0,05µM d'amorces bipartites (PPHlec3, PPHlec4, PPHrr3, PPHrr4)
1µM d'amorce Head2
1,25 U de Taq Polymérase
Eau stérile

PCR biotinylée :

Tampon Taq Buffer 1x
Mg(OAc)₂ 25mM (Eppendorf, Allemagne)
200 µM de dATP, dCTP, dGTP
400 µM de dUTP
10 µM de dATP biotinylés
10 µM de dCTP biotinylés
0,05µM d'amorces bipartites (PPHlec3, PPHlec4, PPHrr3, PPHrr4)
1µM d'amorce Head2
1,25 U de Taq Polymérase
Eau stérile

Rem : La Taq Polymérase est ajoutée en dernier dans la solution dans le but de retarder le plus longtemps possible la réaction de polymérisation qui pourrait se dérouler au niveau d'éventuels dimères d'amorces. Notons également, qu'entre les pièces PCR et avant le lancement du programme PCR sur le 'thermocycler', les tubes PCR contenant la solution sont conservés sur glace dans un même but.

Ajout de l'ADN génomique en pièce PCR2

L'ADN génomique est ajouté à la solution PCR 1 à raison de 50ng par tube PCR (5µl d'ADN pour un volume final de 50µl).

Lancement du programme PCR

Les différents tubes sont insérés au niveau du 'thermocycler' et le programme suivant est encodé et démarré :

Etape	température	temps	cycle
Dénaturation initiale	95° C	5 minutes	1X
Dénaturation	95° C	30 secondes	40X
'Annealing'	56° C	30 secondes	40X
Elongation	72° C	30 secondes	40X
Elongation finale	72° C	10 minutes	1X

Une fois le programme terminé, les échantillons sont stockés à +4°C dans l'éventualité d'une utilisation relativement rapide ou à -20°C pour une plus longue conservation.

II. ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE

Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet une séparation des fragments d'ADN sous l'action d'un champ électrique et en fonction de leur taille. En effet, la vitesse de migration à travers le gel est inversement proportionnelle à la taille de fragments et au pourcentage en agarose du gel utilisé. A pH neutre, les molécules d'ADN sont chargées négativement par leurs groupements phosphates. Sous l'action du champ électrique, celles-ci vont migrer dans le gel vers l'électrode positive.

Une co-migration des fragments d'ADN avec un marqueur de poids moléculaire permet d'estimer la taille de ces premiers (Figure II.3). Le marqueur de poids moléculaire utilisé ici est le 100bp DNA Ladder de Promega. La solution de chargement (colorée par du bleu de bromophénol, de l'orange G et du xylène cyanol) ajoutée aux produits PCR permet quant à elle d'alourdir l'échantillon d'ADN et de suivre la progression de la migration dans le gel d'agarose. Le bromure d'éthidium présent dans le gel d'agarose permet la visualisation sous UV des acides nucléiques (Figure II.4). En effet, il s'agit d'une molécule fluorescente qui s'intercale entre les bases de l'ADN double brin. Lorsqu'elle est intercalée, cette molécule (Masse Molaire 394,31g.mol⁻¹) présente une fluorescence orange sous illumination par des UV courts (excitation 370 et 530 nm, émission 622) (Figure II.5).

Matériel

- Agarose electrophoresis grade (Invitrogen, UK)
- Tampon TBE 1X réalisé à partir de tampon TBE 10x dont la composition est
 - 1M de Tris HCl
 - 0,9M d'acide borique
 - 10mM d'EDTA
- Bromure d'éthidium 500µg/ml (Sigma, Allemagne)
- Blue/Orange Loading Dye, 6x (Promega, USA)
- Marqueur de poids moléculaire 100bp DNA Ladder (Promega, USA)
- Cuve d'électrophorèse Horizon 11.14 (Gibco Brl, USA)
- Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)
- Lampe UV (Vilber-Lourmat, France)
- Appareil photo Kaiser RA1 + Photo-print IP-001-SD (Vilber-Lourmat, France)
- Papier Brillant K65HM (Mitsubishi, Japon) + Imprimante P91 (Mitsubishi, Japon)

Protocole

Préparation du gel d'électrophorèse

- Pour la préparation d'un gel d'agarose 2%, peser 2 g d'agarose et les déposer dans un berlin destiné à la pièce bromure d'éthidium.
- Ajouter 100 ml de tampon TBE 1x.
- Porter à ébullition au micro-onde durant 2 minutes (avec étape d'homogénéisation après 1 minute). La solution doit être bien homogène et translucide.
- Ajouter 15µl de BET et homogénéiser.
- Verser le gel sur le support approprié muni de peignes adéquats et de papier collant sur ses bords.
- Laisser gélifier durant 20 à 30 minutes.

Préparation des échantillons en vue du chargement sur gel

- Pour chaque produit PCR à déposer sur gel, prévoir un microtube contenant 5µl de bleu de chargement.
- Ajouter 10 µl de produit PCR dans ces microtubes.
- Pour chaque ligne utilisée sur le gel (14 puits par ligne), prévoir 1 microtube contenant 5µl de marqueur de poids moléculaire.

Chargement des échantillons sur gel

- Retirer le papier collant et placer le support portant le gel dans la cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE 1x (Figure II.6).
- Retirer délicatement les peignes et charger les puits avec les échantillons lestés au bleu de chargement ; réserver un puits par ligne pour charger l'étalon de poids moléculaire.
- Fermer la cuve à électrophorèse. Brancher ses bornes au générateur et allumer celui-ci. L'intensité du courant est adaptée en fonction de la taille des fragments et du pourcentage en agarose du gel utilisé (120 mV durant 50 minutes pour un gel 2% en agarose avec des amplicons de 120 bp).
- Arrêter le générateur lorsque le front de migration du bleu de chargement atteint le bas du gel.
- Enlever le gel d'agarose du portoir et déposer le gel seul sur banc UV afin de visualiser les acides nucléiques. Photographier le résultat.

III. PURIFICATION DES PRODUITS PCR APRÈS MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE

Principe

Cette technique consiste à purifier les amplicons obtenus suite à une PCR en extrayant du gel le fragment correspondant à la taille de ces amplicons. Après que l'ADN soit mis en présence d'une membrane de silice capable de l'absorber en condition de haute concentration saline et suite à différents lavages, il sera possible de l'isoler. L'ADN lié à la membrane pourra dès lors être élué à l'aide d'eau stérile.

Matériel

- Kit : Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- Centrifugeuse de table (Eppendorf)
- Gel d'agarose 1% contenant les amplicons à purifier

Le kit Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System permet l'extraction et la purification de fragments d'ADN de 100bp à 10 kb à partir d'un gel standard ou à faible teneur en agarose. Il permet également d'isoler l'ADN amplifié directement à partir du produit PCR (Figure III.7). Ce kit de purification se base sur la capacité que possède l'ADN de se lier à une membrane de silice en présence de certains sels. Le taux de récupération peut augmenter jusqu'à 95%, selon la taille des fragments d'ADN (Table III.1).

Protocole

- Faire migrer les échantillons sur gel d'agarose 1%, TBE 1x contenant 15 µl de BET 500 µg/ml, dans une cuve à électrophorèse contenant du TBE 1x.

- Prélever les bandes d'ADN d'intérêt à l'aide d'une lame de scalpel stérile en veillant à minimiser le temps d'exposition aux UV et l'intensité de ceux-ci. Placer ces bandes dans des microtubes préalablement pesés.
- Peser les microtubes avec gel de manière à déduire la quantité de gel découpé (maximum 350 mg de gel par microtube).
- Ajouter un volume de Membrane Binding Solution selon un rapport de 10µl par 10mg de gel d'agarose.
- Vortexer et incubé à 50-65°C pendant 10 minutes jusqu'à dissolution complète du gel. Toutes les 2 minutes, mélanger les tubes par inversion pour favoriser la dissolution.
- Placer un SV Minicolumn (M) dans un Collection Tube (CT) pour chaque microtube avec gel dissous. Transférer les contenus des microtubes dans ces montages et laisser incubé 1 minute à température ambiante.
- Centrifuger les montages M-CT à 13400 rpm pendant 1 minute.
- Vider les contenus des Collection Tube et les replacer sous les SV Minicolumn.
- Ajouter dans les SV Minicolumn 700 µl de Membrane Wash Solution (MWS) (dilué avec 95% d'éthanol lors de la première utilisation du kit).
- Centrifuger 1 minute à 13400 rpm, vider le contenu des CT et recommencer l'opération avec 500 µl de MWS, centrifuger cette fois pendant 5 minutes.
- Jeter les Collection Tube et placer les SV Minicolumn sur de nouveaux microtubes. Centrifuger 1 minute de manière à se débarrasser au maximum de l'éthanol présent dans le MWS.
- Remplacer ces microtubes par des nouveaux. Ajouter dans les SV Minicolumn 50 µl de Nuclease-Free Water directement au centre des colonnes et sans toucher les filtres avec les tips.
- Laisser incubé 1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 13400 rpm.
- Jeter le SV Minicolumn et conserver les microtubes fermés à 4 ou -20°C.

Remarque : ce kit permet également de purifier l'ADN à partir d'un produit PCR selon le même principe qu'une purification d'ADN à partir d'un gel d'agarose.

IV. FIXATION DES ADN TRAPPEURS SUR LAMES FONCTIONNALISÉES

Principe

Le but de cette manipulation est de fixer de manière covalente les ADN trappeurs au niveau d'un support solide fonctionnalisé. Le dépôt des microgouttelettes est réalisé mécaniquement par un robot possédant une aiguille adaptée. Les deux principaux types de supports utilisés sont les lames de verre et les membranes de nylon. Le verre est devenu le support standard, principalement grâce à sa compatibilité avec un système de détection en fluorescence et aux avantages qu'il possède face aux membranes poreuses. Une fonctionnalisation des lames est nécessaire pour qu'une liaison covalente puisse s'établir entre l'ADN trappeur, et le support.

Matériel

- Robot 'Spotteur' (WOW company, Belgique)
- Aiguille de 125 µm de diamètre (Genetix, Angleterre)
- Lames de verre Diaglass fonctionnalisées (EAT, Belgique)
- ADN trappeurs (Eurogentec, Belgique)

- Contrôle de fixation (Chlamydia biotinylé)
- Contrôle positif d'hybridation (C₂B₂) (Eurogentec, Belgique)
- Contrôle négatif d'hybridation (NF-κB) (Eurogentec, Belgique)
- Eau distillée
- Portoir métallique pour lame de microscope (Merck, Allemagne)

Protocole

La fixation des ADN trappeurs et des contrôles se réalise en trois étapes : la préparation des solutions à 'spotter', le dépôt des spots sur lame et le lavage des lames.

Préparation des trappeurs et des différents contrôles à 'spotter'

La préparation des diverses solutions d'ADN trappeur et des différents contrôles se réalise sous hotte. Les solutions stocks sont diluées dans une solution de 'spotting' de manière à obtenir les concentrations qui sont présentées à la table IV.2.

'Spotting' des lames

Cette seconde étape se déroule en pièce blanche (une pièce stérile permettant d'éviter toute contamination extérieure). Le 'spotting' des lames se fait à l'aide d'un robot 'Spotteur' équipé d'une aiguille permettant le dépôt de microgouttelettes de solution à un endroit précis de la lame. L'ordre des différents spots est préalablement enregistré dans un logiciel associé au robot. Outre ce design, d'autres paramètres non décrits ici sont encodés dans le programme : distances inter-spot, cycles de lavages de l'aiguille, etc. Après fixation, une incubation des lames à température ambiante pendant 1h met fin à la procédure. Une vérification du 'spotting' des lames peut dès lors être envisagée. Les lames sont passées au scanner à fluorescence (laser 663nm) qui permet une mise en évidence des sels résiduels se localisant au niveau des spots.

Lavage des lames

Une succession de lavages dans différents tampons est réalisée afin de stabiliser les liaisons ADN-support et dans le but d'éliminer les liaisons non covalentes. Les lames sont enfin rincées à l'eau distillée, séchées à la centrifugeuse (600 rpm, 5minutes) et stockées en chambre froide à 4°C.

V. HYBRIDATION DES PRODUITS PCR BIOTINYLÉS SUR DAMIER ET RÉVÉLATION À L'AIDE DU SILVERQUANT DETECTION SYSTEM

Principe

Les principes de l'hybridation et de la révélation colorimétrique à l'argent ont été respectivement explicités aux paragraphes III.3 et III.5 de l'introduction.

Matériel

- Produits PCR biotinylés
- Four d'hybridation (Hybridiser HB-1D, Techne Duxford, Royaume-Uni)
- Lames de verre préalablement 'spotées' selon le design désiré

- Chambre d'hybridation 65µl (Microarray Gene Frame, Abgene, UK) + couvre-chambre Coverslips (Abgene, UK)
- Boîte de pétri (Stardest, Allemagne)
- Eau distillée
- Contrôle positif d'hybridation C₂B₂b (Eurogentec, Belgique)
- Centrifugeuse de table minispin (Eppendorf, Allemagne)
- Genomic Hybribuffer (EAT, Belgique)
- Solution de lavage (unibuffer, B1 4x) (EAT Belgique)
- Tween 20 100% (SIGMA, USA)
- Porte lames (Staining Box, EAT, Belgique)
- Tampon Silverquant 1x (EAT Belgique)
- Agent bloquant (Skim milk, Difco, USA)
- Conjugué antibiotine-or 6054 (Biocell, UK)
- Solution Silverquant A du kit de révélation (EAT, Belgique)
- Solution Silverquant B du kit de révélation (EAT, Belgique)
- Scanner colorimétrique Silverquant 6000 (Eppendorf, Allemagne)
- Centrifugeuse centra CL3R (Thermo IEC, USA)

Protocole

Hybridation des produits PCR

- Tout d'abord, régler le four à la température d'hybridation souhaitée (65°C) et sortir les lames 'spottées' de la chambre froide.

Dans le but d'éviter toute contamination, les manipulations sont réalisées sous hotte.

- Préparer, une solution d'hybridation dans laquelle le contrôle positif d'hybridation C₂B₂b et les différents produits PCR biotinylés sont ajoutés.
- Coller délicatement les chambres d'hybridation sur les lames, de manière à ce que les damiers se retrouvent au centre. Déposer la solution d'hybridation au milieu de la chambre en veillant à faire attention à ne pas toucher la lame avec le tip.
- Adapter une lamelle couvre-chambre de manière à répartir la solution d'hybridation sur toute la surface délimitée par la chambre.
- Placer les lames individuellement dans des boîtes de Pétri et placer celles-ci à 65°C dans le four d'hybridation pour une incubation d'une heure.

Préparation des tampons

- Les différentes solutions de lavage et rinçage ainsi que les autres tampons peuvent être préparés durant l'incubation. Les volumes présentés à la Table 5 sont ceux nécessaires lors de l'utilisation d'un unique Staining Box pouvant contenir 4 lames (Table V.3).
- Après l'incubation d'1 heure, sortir les lames du four d'hybridation.
- Décoller une à une les chambres à l'aide d'une pince et placer immédiatement les lames dans le porte-lame (staining box) préalablement rempli de tampon de lavage (WB1).
- Effectuer trois lavages d'au moins une minute avec ce même tampon puis remplacer le WB1 par le tampon de pré-blocage pour une incubation de 10 minutes.

Coloration à l'argent

- Préparer le tampon contenant le conjugué antibiotine-or au dernier moment et le plus possible à l'abri de la lumière (pour un porte-lame, il faut compter 17, 15, 13 ou 11 ml selon qu'il contient respectivement 4, 3, 2 ou 1 seule lame) de la façon suivante :

Tampon Conjugué antibiotine-or		Remarques
Tampon du conjugué	11 ml	Le conjugué antibiotine-or est de cette manière dilué 500x
Conjugué antibiotin-or	22 µl	
Volume final pour un porte-lame contenant 4 lames	+/- 11 ml	

- A la fin des 10 minutes, remplacer le tampon de pré-blocage par le tampon conjugué antibiotine-or. Fermer le Staining Box et laisser incuber les lames 45 minutes et remuant régulièrement le Staining Box.
- Réaliser ensuite 4 lavages d'au moins 1 minute avec le tampon de lavage puis un lavage de minimum 1 minute avec le tampon de rinçage.
- Vider ensuite le Staining Box et le remplir avec un volume de Silverquant B (8,5 ml pour 1 lame, 7,5 pour 2, 6,5 pour 3 ou 5,5 ml pour quatre lames).
- Ajouter un volume identique de Silverquant A dans le box contenant déjà la solution B et laisser incuber 5 minutes tout en mélangeant délicatement.
- Laver deux fois minimum 1 minute avec de l'eau distillée.
- Récupérer une à une les lames à l'aide d'une pince et frotter le dos de la lame sur un papier absorbant pour enlever les traces dues à une précipitation non spécifique de l'argent.
- Placer les lames sur un support destiné à la centrifugeuse et sécher les lames à la centrifugeuse durant 5 minutes à 600 rpm.

Numérisation et quantification des résultats

La numérisation des lames est réalisée à l'aide du scanner Silverquant 6000 et du logiciel Silverquant Scan. Les damiers sont numérisés, enregistrés et les images sauvegardées peuvent être ouvertes dans le logiciel Silverquant Analysis qui permet de quantifier les signaux des spots d'hybridation. A chaque spot est attribué une valeur correspondant à la moyenne de l'intensité de l'ensemble des pixels le constituant. Une mesure du bruit de fond entourant chaque spot sera également réalisée par le logiciel. Cette valeur sera soustraite à celle déterminée pour le spot.

VI. EXTRACTION D'ADN À PARTIR DE FARINE DE RÉFÉRENCE PAR LA MÉTHODE CTAB

Matériel

- Farines de référence à teneur certifiée en OGM (Sigma, Allemagne)
- Chloroforme (CHCl_3) (Lab-Scan, Irlande)
- Phénol (Merk, Allemagne)
- Alcool isoamylique (Merk, Allemagne)
- Ethanol ϕ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (98%) (Merk, Allemagne)
- Sel disodique d'acide éthylènediaminetétraacétique ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) ϕ ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$) (Merk, Allemagne)
- Bromure d'hexadécyltriméthylamonium (CTAB) ϕ ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$) (Sigma, Allemagne)
- Acide chlorhydrique (HCl) (37%) (Acros, Belgique)
- Hydroxyde de sodium (NaOH) (Merk, Allemagne)
- Isopropanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) (Merk, Allemagne)

- Chlorure de Sodium (NaCl) (Merk, Allemagne)
- Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (TRIS) ϕ (C₄H₁₁NO₃) (Merk, Allemagne)
- Bain marie à 65°C
- Centrifugeuse (capable de tourner à 13000g)

Protocole

Toute contamination par de l'ADN étranger est évitée par l'utilisation d'équipement à usage unique, par la stérilisation des solutions à l'aide d'une autoclave, par le port de gants en latex et en travaillant sous hotte nettoyée à l'eau de Javel. Les différents tampons sont préparés comme présentés à la Table VI.4.

La marche à suivre présentée ci-dessous a été mise au point spécialement pour l'extraction d'ADN à partir de soja ou de produit dérivé du soja.

Tampon d'extraction

- Transférer une quantité d'échantillon comprise entre 200 mg et 250 mg dans un microtube de 2 ml. Ajouter 1 ml de tampon d'extraction CTAB et mélanger.
- Incuber le mélange à 65°C pendant 30 min à 1 heure et mélanger de temps en temps.
- Centrifuger la suspension pendant 10 min à approximativement 12 000g.
- Transférer le surnageant dans un nouveau microtube.

Extraction d'ADN

- Ajouter 200 μ l de la solution de chloroforme.
- Centrifuger la suspension pendant 10 min à approximativement 12 000g.
- Transférer le surnageant dans un nouveau microtube.

Précipitation CTAB

- Ajouter 2 volumes (par rapport au surnageant) de tampon de précipitation CTAB et mélanger.
- Incuber le mélange pendant 60 min à température ambiante.
- Centrifuger le mélange pendant 5 min à approximativement 12000g.
- Éliminer le surnageant.
- Dissoudre le précipitât dans 350 μ l d'une solution NaCl 1,2M.
- Ajouter 350 μ l de chloroforme et mélanger.
- Centrifuger le mélange pendant 10 min à environ 12000g pour séparer les phases.
- Transférer la phase (aqueuse) du dessus dans un nouveau tube.

Précipitation d'ADN

- Ajouter 0,6 volume (par rapport au surnageant) d'isopropanol.
- Centrifuger le mélange pendant 10 min à approximativement 12 000g.
- Éliminer le surnageant.
- Nettoyer le culot avec 500 μ l de solution d'éthanol.
- Centrifuger le mélange pendant 10 min à approximativement 12 000g.
- Éliminer le surnageant.
- Sécher l'ADN par passage au 'speedvac'.
- Resuspendre l'ADN dans 100 μ l à 400 μ l d'eau ou de tampon TE.

L'ADN est ensuite quantifié et sa pureté évaluée au spectrophotomètre à l'aide de la méthode Genequant. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

VII. MICRO-ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE SUR SYSTÈME DNA 1000 LABCHIP

Principe

Le kit DNA 1000 Labchip développé par la firme Agilent Technologies offre une alternative simple, rapide et intégrée pour l'analyse des échantillons d'ADN possédant une taille allant de 25 à 1000 paires de bases. Cette technologie intègre sur une même "puce" la séparation, la détection, la quantification et la mesure de l'intégrité des échantillons. Douze échantillons peuvent ainsi être analysés en 25 minutes (90 s par échantillon) avec une sensibilité 15 à 30 fois plus élevée qu'un gel d'agarose traditionnel.

La micro-électrophorèse capillaire consiste à faire transiter sous l'action d'un champ électrique les molécules de l'échantillon testé dans un ou plusieurs micro-canaux de diamètres calibrés et de l'ordre de quelques microns. Les molécules progressent dans les micro-canaux à des vitesses différentes et se retrouvent vite séparées en bandes, qu'il suffit de lire après un temps donné de progression. Un laser permet une détection sensible des bandes d'ADN marquées avec un agent intercalant. Un logiciel permet de calculer automatiquement et sur base de marqueurs de poids moléculaire la taille et la concentration de chaque bande séparée.

4^{ème} partie : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Pour rappel, l'objectif principal de ce mémoire est la mise au point d'une approche de PCR compétitive permettant la quantification, sur Biochips, de la teneur en soja transgénique Roundup Ready contenu dans un échantillon d'ADN.

I. MISE AU POINT DES PARAMETRES DE LA PCR COMPETITIVE QUANTITATIVE SELON L'APPROCHE ENVISAGEE PAR RUDI ET ASSOCIES

L'article écrit en 2003 par Rudi et associés intitulé '*A novel multiplexe quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed*' a servi de référence pour la mise au point de la PCR compétitive développée au cours de ce mémoire (Rudi *et al.*, 2003). Il est question d'une méthode se basant sur une PCR en deux étapes (Figure 1). Dans la première, un faible nombre de cycles d'amplification sont réalisés avec des amorces 'Bipartites' possédant une séquence universelle 5', ou séquence 'Head' non complémentaire à l'ADN cible à amplifier, et une partie 3' spécifique à chaque séquence à amplifier. A la fin de ces premiers cycles de PCR, les amorces et les dNTPs en excès sont dégradés respectivement à l'aide de l'exonucléase I et de la phosphatase alcaline (shrimp alkaline phosphatase). Ces deux enzymes sont ensuite dénaturées par la chaleur. Pour la seconde étape, une partie du produit PCR traité aux enzymes est ajoutée à une seconde solution PCR contenant l'amorce 'Head' dont la séquence est identique à la séquence universelle des amorces 'bipartites'. Un nombre plus élevé de cycles d'amplification sont alors réalisés. Cette seconde étape d'amplification avec une unique amorce permet de créer la compétitivité entre les différentes séquences amplifiées et ainsi de rendre la PCR quantitative. En effet, les différentes séquences étant amplifiées avec la même amorce, une modification de certains paramètres de la PCR (par exemple la concentration en sel ou la température d'annealing) se répercutera de manière identique sur leurs amplifications, et les rapports des nombres d'amplicons obtenus pour ces séquences resteront identiques.

Cette méthode a donc été choisie pour être appliquée à la quantification du Soja transgénique Roundup Ready. Une représentation schématique des différentes étapes envisagées est présentée à la Figure 1.

I.1. DESIGN DES AMORCES

Pour la réalisation de la PCR compétitive appliquée au cas du Soja RR, plusieurs types d'amorces ont dû être envisagées. Deux paires d'amorces 'Bipartites' permettent d'amplifier dans un même tube deux séquences. La première est une propre au soja (une partie du gène codant pour la lectine), que le soja soit transgénique ou non. La deuxième séquence, spécifique au transgène, correspond à un morceau de la construction introduite, soit une partie du promoteur P-E35s et une partie de la séquence *ctp4* codant pour un peptide de transit vers le chloroplaste. Il faut également mettre au point la séquence de l'amorce dite universelle qui se retrouvera sur les amorces 'bipartites'.

Les amorces doivent être choisies sur base de leur capacité à amplifier spécifiquement les séquences d'intérêt et sur leur incapacité à former sur elles-mêmes des structures secondaires trop stables telles que des 'hairpins'. Il faut également tenir compte du fait que les différentes amorces 'Bipartites' seront présentes dans une même solution PCR et pourront dès lors former entre elles des structures stables comme des dimères d'amorces, défavorables au

Hetero-dimères (kcal/mol)					
	PPHead	PPHlec _a	PPHlec _b	PPHrr _a	PPHrr _b
PPHead	-3,6	-5	-4,8	-5,1	-3,6
PPHlec _a	/	-5	-6,3	-5,1	-6
PPHlec _b	/	/	-4,8	-5,1	-5,4
PPHrr _a	/	/	/	-5,3	-5,1
PPHrr _b	/	/	/	/	-3,6

Tableau 2. Evaluation de la stabilité des hétéro-dimères formés entre les différentes amorces

Les amorces présentées dans les Tableaux 1 et 2 ne semblent former de structure trop stable, ni avec elles-mêmes, ni entre elles. Elles semblent donc propices aux différentes manipulations qui seront envisagées.

Le Tableau 3 représente les fragments d'ADN amplifiés avec les amorces 'Bipartites' et les amorces 'Head'.

amorces	séquence	séquence amplifiée (5'-3')
PPHlec _{a-b}	lectine	<u>TCCACCCCATCCACATT</u> GGGACAAAGAAACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCGCCGCT <u>TCC</u> <u>TTCAACTTCACCTTCTAT</u>
PPHrr _{a-b}	RR	<u>CCATGTTGTTAATTTGTGCCA</u> TTCTTGAAAGATCTGCTAGAGTCAGCTTGTGAGCGTGTCC <u>T</u> <u>CTCCAAATGAAATGAAC TTC</u>
PPHead	amplicons lec	tgetatgtcacagatgcga <u>TCCACCCCATCCACATT</u> GGGACAAAGAAACCGGTAGCGTTGCCA GCTTCGCCGCT <u>TTCTTCAACTTCACCTTCTAT</u> tgcacatctgtgagcatagca
	amplicons RR	tgetatgtcacagatgcga <u>CCATGTTGTTAATTTGTGCCA</u> TTCTTGAAAGATCTGCTAGAGTCAGC TTGTCAGCGTGTCC <u>CTCTCCAAATGAAATGAAC TTC</u> tgcacatctgtgagcatagca

Tableau 3. Séquences nucléotidiques des fragments amplifiés avec les différentes amorces. La partie soulignée correspond à la séquence complémentaire aux amorces 'Bipartites' et la partie en lettres minuscules à celle de l'amorce universelle.

Remarquons qu'un alignement de séquence 'Blast' a été réalisé sur les séquences des amorces. Les conclusions que l'on peut en tirer sont que les amorces PPHlec et PPHrr sont respectivement complémentaires à la séquence de la lectine et à la séquence du transgène. Quant à l'amorce PPHead, elle ne permet théoriquement d'amplifier que les amplicons obtenus avec les deux premiers couples amorces.

I.2. REALISATION D'UN PREMIER TEST

Sur base des paramètres décrits dans l'article de référence, un premier essai d'amplification du gène de la lectine avec les deux couples d'amorces PPHlec_{a-b} et Head a été réalisé. La marche à suivre a été la suivante :

- préparation d'une solution PCR1 contenant les amorces PPHlec_{a-b} et tous les composants nécessaires au déroulement de l'amplification ;
- réalisation de 5 cycles d'amplification (PCRA) ;
- élimination des amorces et des nucléotides en excès par incubation du produit PCR obtenu avec les enzymes exonucléase I et shrimp alkaline phosphatase (exo I et SAP) à 37°C durant 30 minutes ;
- inactivation de ces deux enzymes à 80°C pendant 15 minutes ;
- transfert de ce produit PCR traité dans une solution PCR2 contenant les composants nécessaires à l'amplification et l'amorce universelle ('Head') ;
- réalisation d'une seconde amplification de 30 cycles (PCRB) ;
- dépôt du produit PCR final sur gel d'agarose et révélation au bromure d'éthidium sous UV.

Aucun amplicon n'a pu être mis en évidence sur gel d'agarose. Ce test a, par ailleurs, été réalisé en parallèle pour les amorces 'Bipartites' PPHrr et n'a également donné aucun résultat. Une hypothèse qui pourrait expliquer l'absence de bandes observables sur le gel est le relativement faible nombre de cycles d'amplification réalisés avec les amorces 'Bipartites', et qui ne permettraient apparemment pas d'obtenir une quantité suffisante d'amplicons. En effet, seuls des amplicons obtenus avec ces amorces pourront être amplifiés avec les 'Head' lors de la seconde étape d'amplification.

Ce test a été répété en faisant passer le nombre des cycles de la PCRA à 7 et à 10 cycles. Cependant, tout comme pour les conditions précédentes, aucun amplicon n'a pu être mis en évidence sur gel. Différents tests ont donc été envisagés dans le but de déterminer la cause des problèmes. Le premier test à réaliser est de s'assurer de la 'fonctionnalité' des amorces 'Bipartites'.

I.3. TEST DE FONCTIONNALITE DES AMORCES 'BIPARTITES'

pour cet essai, un nombre variable de cycles de PCR ont été réalisés sur la lectine à l'aide de la paire d'amorces 'Bipartites' PPHlec :

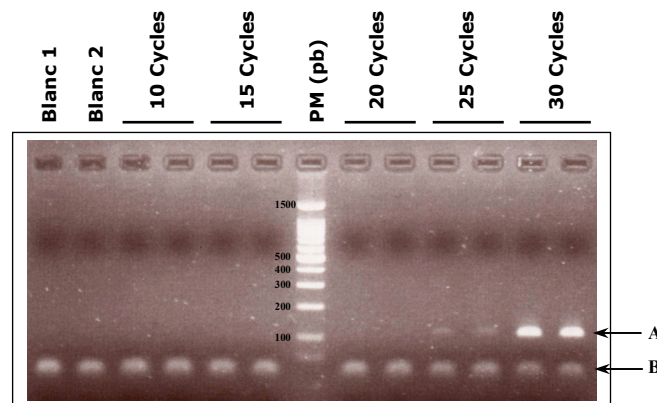


Figure 3. Gel d'électrophorèse sur lequel ont été déposés les amplicons issus de différentes PCR réalisées avec les amorces PPHlec_{a-b}. Les PCR ont été arrêtées après 10, 15, 20, 25 et 30 cycles d'amplification (remarquons que ce test ne comporte aucune étape impliquant les enzymes *exo1* et *SAP*).

On peut remarquer qu'à partir de 25 cycles d'amplification PCR, les amplicons dus aux amorces PPHlec sont visibles sur gel (A), ce qui confirme le rôle des amorces 'Bipartites' PPHlec. Il est également plus que probable que l'amplification de la séquence de la lectine soit déjà bien 'amorcée' après 20 cycles de PCR. Les bandes observées au fond de tous les puits, à l'exception de celui contenant l'étalon de poids moléculaire, correspondent sans doute aux amorces 'Bipartites' (B).

Suite à ces considérations, il était logique de supposer que la manipulation complète incluant et les amorces 'Head' et l'étape d'inactivation puisse donner des résultats avec un nombre de cycles de PCRA fixé à 20. Malheureusement, une fois encore, aucun amplicon n'a pu être observé sur le gel d'électrophorèse (résultats non présentés).

On peut émettre plusieurs hypothèses quant à l'insuccès de ces amplifications :

- soit il y a un obstacle à l'amplification avec l'amorce 'Head' des amplicons obtenus lors de la PCRA,
- soit il y a un problème d'inactivation des enzymes exonucléase1 et shrimp alkaline phosphatase,
- soit un inhibiteur de PCR est présent dans les solutions d'enzymes et n'est pas inactivé.

I.4. TEST DE FONCTIONNALITE DE L'AMORCE 'HEAD'

Suivant le 'design' des amorces, seuls des amplicons issus d'une PCR réalisée avec les amorces 'Bipartites' peuvent à leur tour être amplifiés avec l'amorce universelle. Une des manières envisageables pour l'isolement de ces premiers amplicons est la réalisation d'une amplification PCR avec les amorces 'Bipartites', puis une migration sur gel d'agarose. Celle-ci permet de séparer les amplicons des amorces et des composants présents en excès dans la solution PCR. Finalement, une extraction et une purification des amplicons à l'aide d'un kit de purification des produits PCR (kit Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) doivent être réalisées.

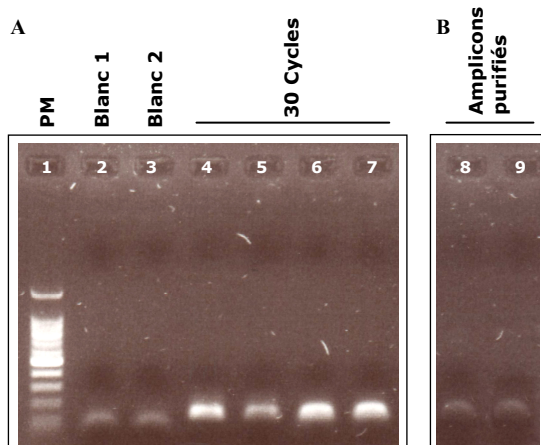


Figure 4. A : Amplification PCR de 30 cycles réalisés avec les amorces 'Bipartites' PPHlec, puis migration sur gel d'agarose. Les 4 dernières bandes ont été extraites du gel et les amplicons purifiés à l'aide d'un kit de purification.

B : Dépôt, sur gel d'agarose, d'une partie des amplicons purifiés comme contrôle au bon déroulement de la purification.

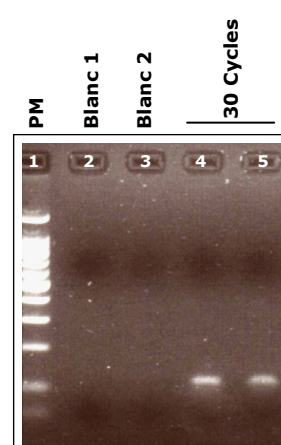


Figure 5. Les amplicons purifiés ont été dilués (10x) puis ajoutés à une solution PCR contenant les amorces universelles 'Head'.

Après 30 cycles d'amplification, les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose.

Les bandes observables au fond des puits 4 à 7 de la Figure 4A correspondent aux amplicons obtenus avec les amorces PPHlec_{a-b}. Il en va de même pour les bandes de faible intensité se trouvant au fond des puits 8 et 9 de la Figure 4B. Celles-ci indiquent que la purification des amplicons à partir des bandes découpées dans le gel A (bandes des puits 4 à 7) s'est bien déroulée. Les bandes observables dans les puits 4 et 5 de la Figure 5 correspondent à ces mêmes amplicons purifiés, dilués 10x, et ré-amplifiés avec les amorces 'Head'. Les résultats obtenus confirment la capacité des amorces 'Head' à amplifier de manière spécifique les amplicons issus d'une PCR réalisée avec les amorces 'Bipartites'. On peut cependant remarquer que les signaux des bandes correspondant aux amplicons générés avec les amorces

universelles (dans les deux derniers puits du gel de la Figure 5) ne sont pas fort intenses pour une amplification de 30 cycles. Cela pourrait provenir d'une faible efficacité d'amplification avec les amorces universelles. Le test suivant a donc été réalisé afin de juger de cette efficacité d'amplification (Figure 6).

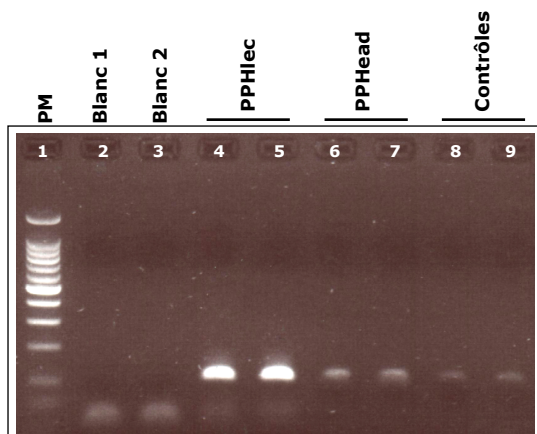


Figure 6. Les amplicons préalablement obtenus avec les amorces PPHlec et purifiés à l'aide du kit d'extraction ont été ajoutés dans deux solutions PCR différents : un premier contenant les même amorces PPHlec et un second contenant les amorces 'Head'. Une PCR de 40 cycles a été réalisée et les produits ont été déposés sur gel d'agarose. Un contrôle correspondant aux amplicons extraits non amplifiés a également été inclus au test.

Les amplicons lec purifiés constituent les bandes de faible intensité présentes au fond des puits 8 et 9. Les bandes dans les puits 4 à 5 et 6 à 7 correspondent respectivement aux amplicons lec purifiés et ré-amplifiés respectivement avec les amorces PPHlec_{a-b} et PPHead. On peut observer, par comparaison avec le contrôle, qu'il y a bien eu amplification, que ce soit avec les amorces 'Bipartites' ou 'Head'. Cependant, l'amplification réalisée avec les amorces 'Head' est inférieure à celle générée avec les premières, l'intensité des bandes des puits 4 et 5 étant supérieure à celle des bandes des puits 6 et 7.

1.5. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PCR

Afin d'améliorer cette efficacité d'amplification avec les amorces 'Head', les paramètres de PCR sont optimisés. Il s'agit plus précisément de rendre optimales la concentration en ions Mg^{++} et la température d'annealing (température à laquelle les amorces vont s'apparier avec les ADN simples brins). Les résultats obtenus sont présentés aux Figures 7 et 8.

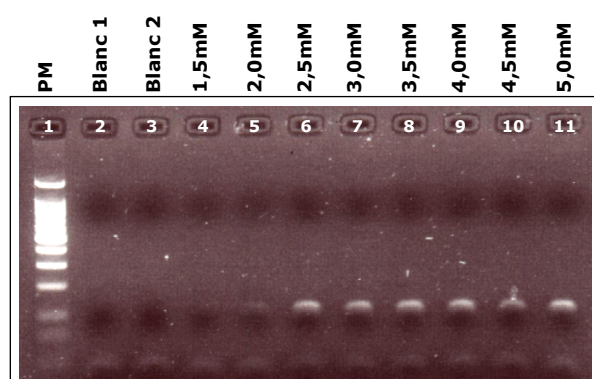


Figure 7. Des amplicons obtenus avec les amorces PPHlec (40 cycles) et purifiés ont été ajoutés à une solution PCR contenant les 'Primers Head'.

Une amplification PCR a été réalisée pour différentes concentrations en Mg^{++} et les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose.

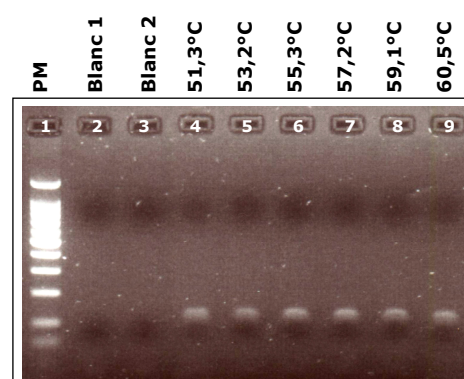


Figure 8. Des amplicons obtenus avec les amorces PPHlec (40 cycles) et purifiés avec le kit ont été ajoutés à une solution PCR contenant les 'Primers Head'.

Une amplification PCR selon un gradient de température d'annealing de 51,3 à 60,5°C a été réalisée et les produits PCR obtenus ont été déposés sur gel.

On remarque à la Figure 7 que l'intensité des bandes dues aux amplicons augmente entre les puits 4 et 6, et se stabilise pour les puits suivants. Nous pouvons donc conclure qu'en ce qui concerne la concentration en ions Mg^{++} (auparavant fixée à 1,5mM) l'efficacité d'amplification est bien plus importante en présence d'une concentration égale ou supérieure à 2,5mM en Mg^{++} . La concentration en ions Mg^{++} sera donc fixée pour les expériences futures à 2,5mM.

L'intensité des bandes correspondant aux amplicons générés par les amorces 'Bipartites' puis 'Head' semble être identique pour les différentes températures testées (Figure 8, puits 4-9) Il ne semble pas y avoir une température, dans la gamme testée, qui soit particulièrement plus favorable que les autres à l'amplification avec les amorces 'Head'. La température d'annealing sera donc fixée pour l'ensemble des expérimentations ultérieures à 56°C, c'est-à-dire celle utilisée lors des expériences précédentes.

Remarquons que si l'amplification se déroule plus favorablement en présence d'une plus haute teneur en sels, et plus particulièrement en Mg^{++} , il faut tenir compte du fait qu'une concentration saline élevée est également propice aux amplifications non spécifiques. Théoriquement, il en va de même pour la température d'annealing: une diminution de celle-ci est sensée améliorer l'efficacité d'amplification mais également permettre les amplifications non spécifiques. Au plus la température est basse et la concentration en Mg^{++} élevée, au moins les conditions d'amplification sont stringentes, et donc au plus les amplifications non spécifiques seront fréquentes.

I.6. TEST DE FONCTIONNALITE DES ENZYMES EXO1 ET SAP

Pour rappel, les enzymes exonucléase1 et shrimp alkaline phosphatase (SAP) ont respectivement pour rôle de cliver les ADN simples brins, tels que les amorces, et de dégrader les nucléotides et nucléosides.

Le test suivant a été réalisé pour contrôler la capacité de l'exonucléase1 à cliver les amorces 'bipartites' en excès (Figure 9).

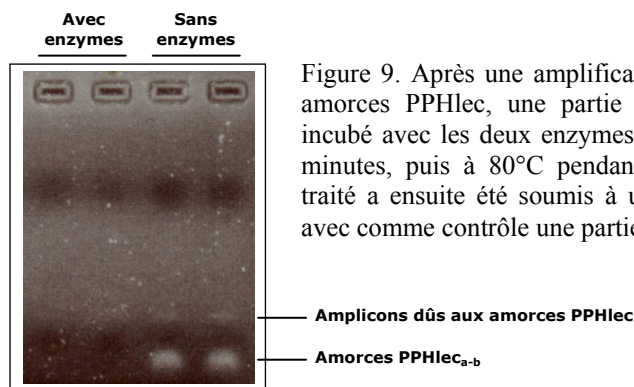


Figure 9. Après une amplification PCR de 25 cycles avec les amorces PPHlec, une partie du produit PCR obtenu a été incubé avec les deux enzymes exo1 et SAP à 37°C durant 30 minutes, puis à 80°C pendant 15 minutes. Ce produit PCR traité a ensuite été soumis à une migration sur gel d'agarose avec comme contrôle une partie du produit PCR non traité.

La première bande observée dans les puits contrôles (sans enzymes) correspondent aux amplicons obtenus avec la paire d'amorces PPHlec durant les 25 cycles de PCR. La deuxième bande correspond aux amorces elles-mêmes. Dans les puits correspondants aux produits PCR incubés en présence d'exonucléase1 et de SAP, on n'observe plus de bandes correspondant aux 'primers'. Ceci confirme la capacité des enzymes utilisées à cliver les amorces d'ADN simples brins. Par contre, il n'a pas été possible d'expliquer la raison pour laquelle le signal des amplicons s'est atténué dans les puits 'avec enzymes'. (Le signal n'est pas visible sur photo mais était toujours perceptible sur banc UV). En effet, les enzymes sont normalement spécifiques à l'ADN simple brin et ne devraient donc pas affecter les amplicons doubles brins.

I.7. TEST D'INACTIVATION DES ENZYMES EXONUCLEASE1 ET PHOSPHATASE ALCALINE A LA CHALEUR

L'expérience suivante (Figure 10) est réalisée dans le but de vérifier l'inactivation des enzymes exo1 et SAP lors de l'étape d'incubation de 15 minutes à 80°C.

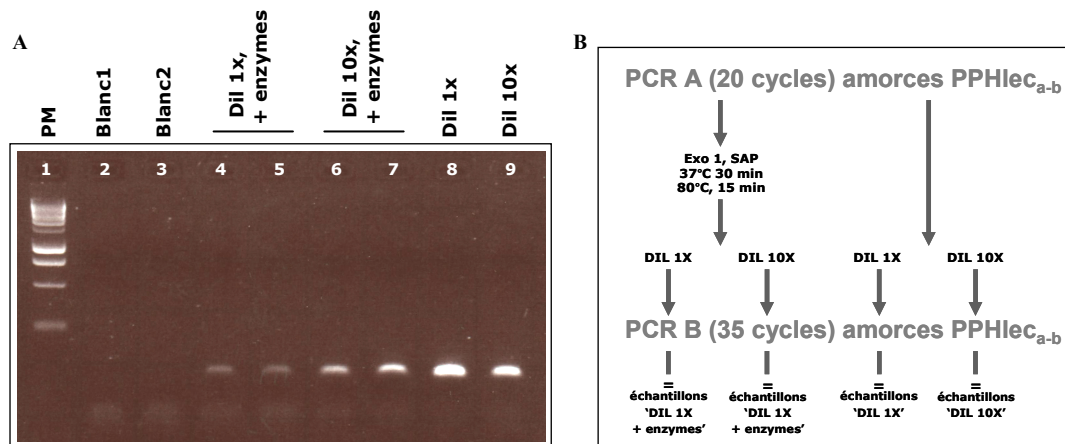


Figure 10 B. Des amplicons sont obtenus grâce à une PCR de 20 cycles réalisée avec les amorces 'Bipartites' PPHlec_{a-b}. Une partie de ce produit PCR est traitée enzymatiquement avec l'exo1 et la SAP à 37 puis 80°C durant des temps d'incubation de respectivement 30 et 15 minutes. Un contrôle non soumis aux enzymes est également inclus au test. Ces deux échantillons, avec et sans traitement enzymatique, sont dilués 1 et 10x. Ces différents échantillons dilués sont ajoutés à une nouvelle solution PCR contenant les amorces PPHlec pour la réalisation d'une seconde amplification PCR de 35 cycles (Figure 10 B). Les différents produits PCR obtenus sont finalement soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 10 A).

Les bandes que l'on observe dans les puits 4 à 9 correspondent aux amplicons obtenus pour les différentes conditions testées. On peut remarquer que l'intensité des bandes, reflétant le nombre d'amplicons, augmente entre les conditions dil 1x + enzymes et dil 10x + enzymes, mais qu'elle diminue entre les conditions dil 1x et dil 10x. Les résultats obtenus en l'absence de traitement enzymatique sont logiques dans la mesure où l'on considère que la dilution 10x restreint la quantité d'ADN avec laquelle démarre la seconde PCR. Il en résulte donc un moindre nombre d'amplicons obtenus après amplification comparativement à celui généré dans le cas de la dilution 1x. On se serait attendu à tirer de mêmes conclusions pour les conditions avec traitement enzymatique, dilutions 1x et 10x, mais ce n'est pas le cas. L'amplification PCR2 semble être favorisée dans le cas où le produit de PCR1 traité avec l'exo1 et la SAP est dilué 10x. On peut dès lors soupçonner la présence d'un inhibiteur de PCR dans la solution d'enzymes ajoutées, ou encore l'absence d'une inactivation des enzymes à la chaleur (80°C, 15 min). Une dilution 10x de ces inhibiteurs et/ou enzymes encore actives aurait un effet favorable au déroulement de la seconde PCR malgré la dilution simultanée des amplicons de PCR1.

Le test présenté à la Figure 11 a été réalisé en vue de confirmer ces hypothèses.

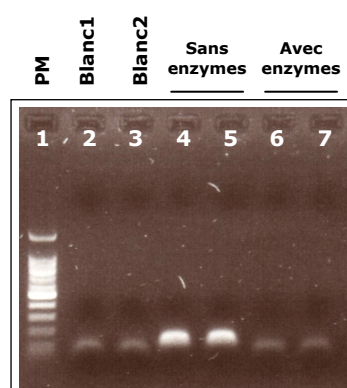


Figure 11. Une solution contenant les enzymes exonucléase1 et phosphatase alcaline a été incubée à 95°C durant 20 minutes, puis a été ajoutée à une solution PCR contenant les amorces universelles PPHlec pour la réalisation d'une amplification PCR de 35 cycles. Un contrôle sans enzymes a également été inclus au test.

Dans les puits 2, 3, 6 et 7 il ne semble pas y avoir eu d'amplification, les seules bandes observables sont en fait les amorces PPHlec_{a-b}. La forte intensité des bandes visibles dans les pistes 4 et 5 reflète l'amplification dues aux amorces 'Bipartites'.

Les résultats obtenus confirment les hypothèses préalablement exprimées, à savoir la présence d'inhibiteurs de PCR ou d'enzymes exo1 ou SAP toujours actives, même après incubation à 95°C durant 20 minutes. En effet, les amplicons présents dans les puits 4 et 5 correspondant à l'absence de traitement enzymatique ne se retrouvent pas dans les deux puits 'avec enzymes'. Cependant, le fait que l'on observe les bandes dues aux amorces dans ces deux derniers puits 6 et 7 semble suggérer la présence d'un inhibiteur de PCR plutôt qu'une non-inactivation des enzymes exonucléase1 et phosphatase alcaline.

Remarquons, par ailleurs, que deux enzymes provenant d'une autre firme que celle des enzymes préalablement utilisées ont été testées sans succès, de même qu'un protocole utilisant des quantités d'enzymes inférieures à celles utilisées auparavant (résultats non présentés).

Un autre test a été réalisé où seule l'enzyme exonucléase1 a été utilisée en concentrations décroissantes pour la dégradation des amorces de PCR1 en excès. Ici encore, aucune amplification n'a pu être observée après réalisation de la seconde PCR (résultats non présentés).

II. MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE APPROCHE DE PCR COMPETITIVE QUANTITATIVE

Les complications rencontrées durant les essais de mise au point de la technique de PCR compétitive quantitative comme décrite par Rudi et associés, ainsi que le nombre important d'étapes se succédant lors de la réalisation du test complet, nous ont conduits à envisager une nouvelle approche. Il s'agit également d'une PCR compétitive entre l'OGM et la plante, et plus précisément entre une séquence propre au soja transgénique RR et la séquence de la lectine du soja. Elle se base comme précédemment sur l'utilisation des amorces 'Bipartites' et universelles, mais le principe est différent.

Dans un unique tube PCR, les deux paires d'amorces 'Bipartites' spécifiques à la plante et au transgène sont ajoutées, ainsi que l'amorce 'Head'. Cette dernière est choisie en large excès par rapport aux amorces 'Bipartites' (Figure 12). En effet, une quantité relativement faible d'amorces 'Bipartites' permettrait d'amplifier les séquences de la plante et de l'OGM uniquement durant les premiers cycles de PCR.

Les différents amplicons obtenus pourraient dès lors être eux-mêmes amplifiés avec une efficacité identique grâce aux amorces 'Head' présentes dans la solution PCR, ce qui assurerait l'aspect quantitatif de cette PCR.

Remarquons que cette nouvelle approche présente plusieurs avantages par rapport à la précédente méthode employée : elle permet d'éviter les problèmes rencontrés avec l'utilisation des enzymes exonucléase1 et phosphatase alcaline. D'autre part, sa mise en œuvre requiert moins d'étapes, et en conséquence, cette méthode est moins sujette aux contaminations. En effet, contrairement à la méthode préalablement employée, elle ne comprend qu'une unique PCR et ne nécessite donc pas l'ouverture des tubes avant la fin des amplifications. Cependant, cette nouvelle approche est plus délicate car elle requiert une détermination adéquate des paramètres employés lors de PCR et plus précisément les quantités en amorces 'Bipartites' et 'Head' à utiliser.

II.1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN AMORCE 'BIPARTITES'

Le but du test suivant est de déterminer, pour une quantité d'ADN fixée à 50ng et un nombre de cycles donné (40 dans le cas présent), la concentration minimale en amorces 'Bipartites' à utiliser afin de générer les amplicons sur lesquels s'hybrideront les amorces 'Head'. Cela permettra, en fin de PCR, d'obtenir une quantité appréciable d'amplicons à hybrider sur chips. L'expérience est décrite à la Figure 13.

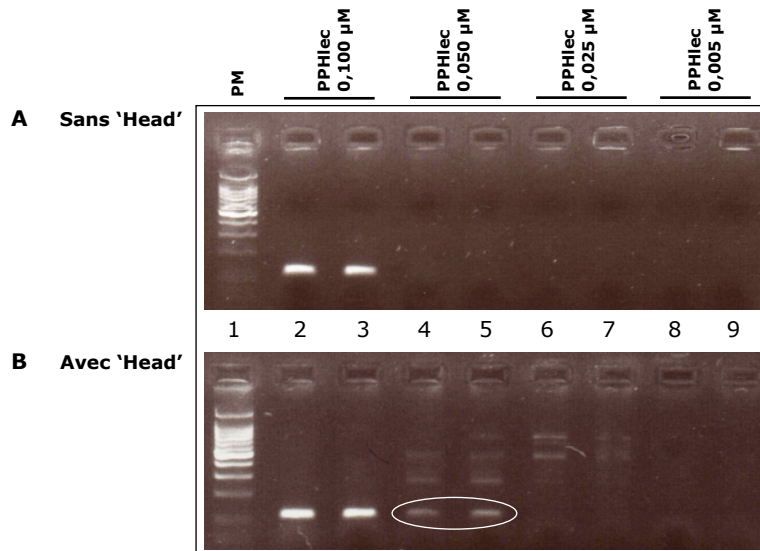


Figure 13. Une série d'amplifications PCR de 40 cycles ont été réalisées pour différentes solutions PCR contenant une concentration identique en amorces 'Head' (1µM) et des concentrations décroissantes en amorces 'Bipartites' PPHlec_{a-b} (de 0,100 à 0,005 µM) (Figure B). Une seconde série d'amplifications ont été réalisées simultanément pour de mêmes concentrations en amorces 'Bipartites' mais sans inclure les amorces 'Head' (Figure A). Les produits PCR obtenus ont ensuite été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose

Sur la Figure A, les bandes observées dans les puits 2 et 3 correspondent aux amplicons générés par les amorces 'Bipartites', alors que celles visibles dans les puits 2, 3, 4 et 5 de la Figure B correspondent aux amplicons obtenus avec les amorces 'Bipartites' et 'Head'. On peut, par ailleurs, noter sur cette seconde Figure la présence de bandes de plus haut poids moléculaire dans les puits 4 à 7 (PPHlec 0,050 et 0,025µM).

On remarque qu'en l'absence d'amorce 'Head' (Figure 13A), la concentration minimale en amorce PPHlec à utiliser pour pouvoir détecter les amplicons sur le gel est de 0,100 µM, dans les conditions actuelles de PCR. On peut donc logiquement conclure que les amplicons obtenus avec 0,05µM de PPHlec_{a-b} et les amorces 'Head' (1µM) (bandes entourées sur la seconde Figure) sont bien dues à une amplification réalisée par les amorces 'Head', mais obligatoirement initiées avec les amorces 'Bipartites'.

Si les bandes de plus haut poids moléculaire observée dans les puits 4 à 7 de la Figure B correspondent à une amplification d'ADN causée par une hybridation non spécifique des amorces 'Head' sur l'ADN génomique, pourquoi ne les retrouvent-t-on pas dans les puits précédents ? Notons, par ailleurs, qu'il ne peut en aucun cas s'agir d'une hybridation non spécifique des amorces 'Head' sur les amplicons primaires, puisque les fragments amplifiés seraient alors de plus faible poids moléculaire que ces amplicons. Ce type d'expériences a été réalisé plusieurs fois et des résultats similaires ont été obtenus.

II.2. IDENTIFICATION DE LA NATURE DES BANDES INATTENDUES

A la suite des derniers résultats obtenus, un test supplémentaire a été mis au point dans le but de déterminer la provenance des bandes parasites observées (Figure 14).

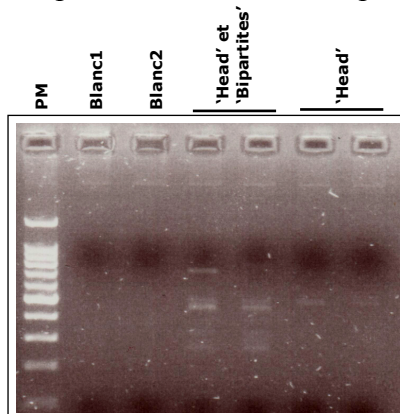


Figure 14. Deux solutions PCR ont été réalisées : une première contenant les amorces 'Bipartites' et 'Head' avec des concentrations respectivement égales à 0,025 μM et 0,1 μM , et une seconde ne contenant que les 'Head' à une concentration de 0,1 μM . Une PCR de 40 cycles a été accomplie et les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose.

Les bandes parasites observables dans les deux conditions 'avec et sans amorces 'Bipartites' semblent suggérer que celles-ci sont bien dues à une hybridation non spécifique des amorces universelles sur l'ADN génomique. Il semble néanmoins que la présence des amorces 'Bipartites' favorise l'apparition de ces bandes. Il n'a pas été possible de déterminer pourquoi aux plus hautes et aux plus faibles concentrations en amorces 'Bipartites' ces bandes n'apparaissent plus (cf Figure 13). D'autres expériences pourraient sans doute permettre de déterminer la nature de ces bandes, mais n'ont pas pu être envisagées dans le cadre de ce mémoire.

Malgré la présence de ces bandes parasites, les résultats obtenus avec cette nouvelle approche de PCR compétitive répondent à nos attentes. Les conditions de 0,1 μM et 0,05 μM pour les concentrations respectives en amorces 'Head' et 'Bipartites' sont retenues pour la réalisation d'une PCR duplexe biotinylée sur le RRS et sur le soja. Les produits PCR obtenus pourront alors être hybridés sur damier et les résultats d'hybridations pourront être quantifiés.

III. ELABORATION DE LA BIOCHIPS PERMETTANT LA DETECTION ET LA QUANTIFICATION DES TRANSGENES

Comme nous l'avons vu auparavant, la teneur en OGM dans un échantillon donné peut être déterminée sur base d'une droite de calibration donnant le pourcentage en OGM en fonction du rapport des signaux OGM et plante détectés sur Biochips.

La droite de calibration est mise au point via l'utilisation de farines de référence à teneurs certifiées en OGM. En effet, l'ADN de ces farines est extrait, sa pureté évaluée, et sa concentration déterminée. L'approche de PCR compétitive qui a préalablement été mise au point est utilisée pour amplifier de manière compétitive et simultanée les séquences propres au soja et au RRS présentes dans les différents extraits de farines de référence (Figure 15). Les produits de PCR biotinylés obtenus sont hybridés sur un damier à ADN présentant des sondes de capture spécifiques aux deux séquences amplifiées. La méthode de détection colorimétrique par précipitation à l'argent est utilisée comme système de détection de l'hybridation. Les résultats obtenus pour les différents échantillons sont quantifiés et reportés sur un graphique du pourcentage en OGM en fonction du rapport signal-RR/signal-lectine. La droite de calibration est dès lors tracée et peut servir à déterminer la teneur potentielle en soja transgénique Roundup Ready dans un échantillon donné.

III.1. IMAGINATION DU 'DESIGN' DE LA BIOCHIPS

Les sondes de capture et les autres contrôles, sous forme d'ADN simples brins modifiés porteurs d'une amine, seront déposés à l'aide d'un robot 'spotteur' sur un support fonctionnalisé porteur de groupements aldéhydes. Un lien covalent pourra alors s'établir, permettant un maintien ferme des séquences nucléotidiques au support.

Le damier devra comporter des spots de sondes de capture spécifiques à la séquence plante amplifiée, ainsi que d'autres spécifiques à la séquence RR amplifiée chez le transgène. En plus de ces ADN 'trappeurs', chaque microdamier devra posséder deux types de contrôle : des contrôles d'hybridation positifs et négatifs permettant de s'assurer du bon déroulement de l'hybridation. Des brins d'ADN biotinylés seront également 'spottés' sur les lames afin de servir de contrôle de fixation. Il s'agit, dans le premier cas, de 'spotter' sur lames des sondes nucléotidiques dont les brins complémentaires biotinylés seront ajoutés à l'échantillon à hybrider. Dans le cas du contrôle négatif, il s'agit de brins trappeurs pour lesquels il n'y a théoriquement aucune séquence complémentaire présente dans l'échantillon d'ADN de départ.

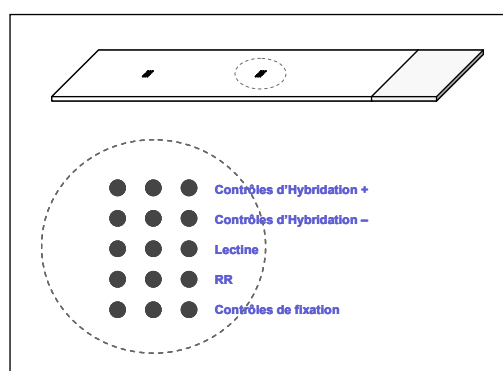


Figure 16. 'Design' du damier utilisé pour la quantification du soja Roundup Ready

Le tableau ci-dessous (Tableau 4) reprend les séquences des fragments d'ADN 'spottés' servant de sondes de capture pour la lectine et le RR, ainsi que des fragments utilisés pour l'établissement de contrôles positifs et négatifs d'hybridation.

Séquences des sondes de capture (5'-3')	
'trappeur' lectine	AACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCG
'trappeur' RR	CTTGAAAGATCTGCTAGAGTCAGCTTGTCAGCG
'trappeur' CTL+ d'hybridation	CACATCTCATGCTGAGTCACTTCCC
'trappeur' CTL- d'hybridation	GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT

Tableau 4. Séquences nucléotidiques des sondes de captures présentes sur le damier

III.2. PREMIER ESSAI D'HYBRIDATION SUR DAMIER

Des échantillons d'ADN isolés de farines de référence possédant des teneurs en OGM de 0,1-0,5-1-2 et 5% seront amplifiés par PCR. Ces produits biotinylés seront ensuite hybridés sur damier. Les mises au point des concentrations en amorces ('Bipartites' et 'Head') et les conditions PCR ont été décrites précédemment au paragraphe II. Remarquons que nous nous limitons ici, comme dans les manipulations suivantes, à la mise au point d'une droite de calibration permettant de déterminer la teneur en RRS dans une gamme allant de 0,1% à 5%.

Le Tableau 5 reprend les concentrations des différentes amorces présentes dans la solution ainsi que le nombre de cycles PCR réalisés lors de l'amplification :

Concentration en amorces 'Bipartites'	0,05 μ M
Concentration en amorces 'Head'	1 μ M
Quantité initiale d'ADN (farines)	50ng
nombre de copies de lectine	~88 000 copies/100ng
Nombre de cycle PCR	40

Tableau 5. Conditions à mettre en œuvre pour la réalisation de la PCR compétitive. Les autres paramètres de PCR sont identiques à ceux présentés dans la partie Matériel et Méthodes.

Une fois les PCR terminées, une partie des amplicons est soumise à une électrophorèse sur gel d'agarose, afin de s'assurer qu'il y a bien eu amplification (résultats non présentés). Dans le cas où les amplicons sont décelables sur gel, l'hybridation peut être réalisée. Notons que même si les amplicons ne sont pas observables sur gel, il se peut qu'ils soient détectables sur Biochips. En effet, la sensibilité de détection de ces dernières est bien plus importante qu'un simple gel d'agarose. Celui-ci nous sert néanmoins de contrôle rapide puisque la quantité d'amplicons obtenus avec les conditions de PCR utilisées doit pouvoir être observée sur gel (confer paragraphe II.1).

Les conditions d'hybridation n'ont pas fait l'objet d'une optimisation dans le cadre de ce mémoire, car elles l'ont été auparavant, lors de la mise au point de damiers porteurs de mêmes sondes de capture. Il s'agit, plus particulièrement, des concentrations salines et de la température d'hybridation (confer Matériel et Méthodes)

Les résultats obtenus après hybridation sur damier des produits PCR biotinylés, pour des teneurs différentes en RRS, ont été révélés par précipitation à l'argent puis numérisés à l'aide d'un scanner colorimétrique (Figure 17).

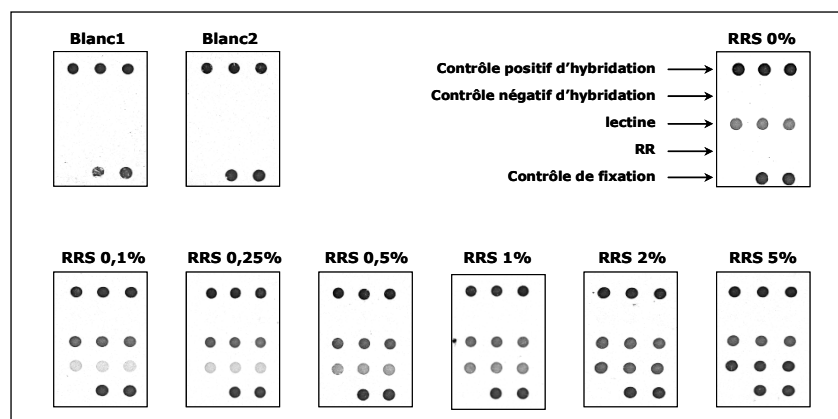


Figure 17. Résultats d'hybridation numérisés à l'aide d'un scanner colorimétrique.

Aucune contamination n'est détectée dans les blancs 1 et 2, correspondant respectivement à des solutions PCR dans lesquelles l'ADN génomique a été remplacé par de l'eau en pièce PCR1 et en pièce PCR2. Ils permettent ainsi de s'assurer qu'aucune contamination des solutions PCR avec des amplicons issus d'une PCR préalable ne puisse venir fausser les résultats de l'amplification PCR, et donc les résultats observés sur chips.

Les contrôles de fixation ainsi que les contrôles d'hybridation génèrent effectivement des spots détectables sur le damier. Les contrôles négatifs d'hybridation reflétant la spécificité des hybridations sont, quant à eux, parfaitement négatifs. Comme on pouvait s'y attendre, dans le cas du contrôle RRS 0%, un signal est détecté pour la lectine mais aucun n'est observé pour le RRS.

Une fois les résultats d'hybridation numérisés, les spots peuvent être quantifiés à l'aide du logiciel Silverquant Analysis (Tableau 6).

A		réplicat	0,10%	0,25%	0,50%	1,00%	2,00%	5,00%
lectine	a		37663,0	39867,0	37755,0	35321,0	38393,0	39461,0
	b		37119,0	37199,0	39175,0	36535,0	37745,0	39369,0
	c		36083,0	34369,0	40071,0	32839,0	36583,0	39641,0
RR	a		9693,0	11883,0	23287,0	27155,0	38631,0	46755,0
	b		8337,0	11127,0	22861,0	26265,0	37023,0	47087,0
	c		8475,0	11447,0	22557,0	26381,0	38159,0	47127,0

B			0,10%	0,25%	0,50%	1,00%	2,00%	5,00%
Moyennes	lec		36955,00	37145,00	39000,33	34898,33	37573,67	39490,33
	RR		8835,00	11485,67	22901,67	26600,33	37937,67	46989,67
Rapport	RR/lec		0,2391	0,3092	0,5872	0,7622	1,0097	1,1899

Tableau 6. Pour chacun des spots lectine et RR quantifiés, la valeur obtenue correspond à la moyenne de l'intensité de l'ensemble des pixels constituant le spot et corrigée par la valeur du bruit de fond mesuré (A). Une moyenne de l'intensité des triplicats est ensuite calculée pour chaque échantillon et les rapports des moyennes des intensités RR/lec peuvent être établis (B)

Les résultats obtenus pour les spots correspondant aux 'trappeurs lectine' et 'trappeurs RR' correspondent à nos attentes. Les signaux lectine (spot lec) ont une intensité proche pour les six échantillons d'ADN testés, ce qui reflète des quantités semblables en amplicons lectine. Quant à l'intensité des signaux RR, elle augmente progressivement en fonction de la teneur en transgène dans les différents échantillons. En effet, si dans les 50ng d'ADN des six extraits de farines testées, le nombre de copies de lectine est identique (environ 44000 copies), il n'en va pas de même pour le RR. Dans cette même quantité d'ADN provenant des farines de 0,1 à 5% en OGM sont contenus respectivement entre 44 et 2200 copies de RR. On remarque cependant que les spots RR des deux damiers RRS 2 et 5% ont une intensité dépassant celle des spots lec. Cela a déjà été observé lors d'études préalables impliquant l'utilisation de damiers possédant les mêmes sondes nucléotidiques de capture, et semble être dû à une meilleure efficacité d'hybridation des amplicons sur les sondes RR que sur les sondes lec. Cette hypothèse sera néanmoins confirmée par la technologie de micro-électrophorèse capillaire développée par la firme Agilent Technologies.

Le graphe suivant reprend les valeurs d'intensité moyenne des spots lec et RR obtenus pour les différentes farines de référence testées.

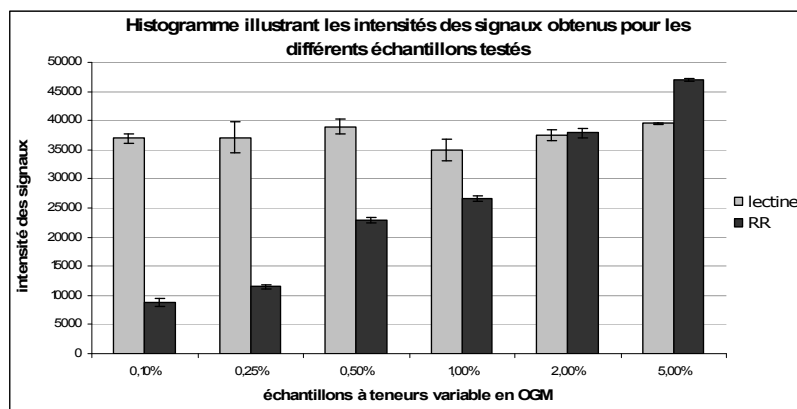


Figure 18. Valeurs d'intensité moyenne des spots lec et RR pour différents pourcentages en OGM

Sur base des résultats de quantification, une droite de calibration peut être dressée. Celle-ci permet de déterminer le pourcentage en soja transgénique Roundup Ready présent dans un échantillon en fonction du rapport des signaux RR/lec.

Pour la mise au point de différentes droites de calibration présentées dans la suite des résultats, seuls les signaux significativement supérieurs au bruit de fond ont été pris en

compte. On entend par là qu'il n'est pas tenu compte des signaux dont la valeur est inférieure à 1500, c'est-à-dire inférieure à approximativement 10x la valeur moyenne du bruit de fond mesurée pour les différents damiers. Les points faisant référence à des signaux trop faibles sont néanmoins représentés sur les graphes, mais sont entourés de cercles.

La droite de calibration semi logarithmique est réalisée sur base des rapports calculés au Tableau 5B (Figure 19).

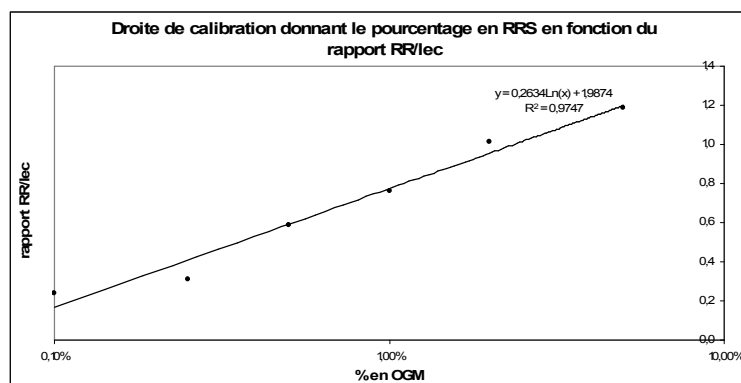


Figure 19. Droite de calibration mise au point sur base des résultats calculés au Tableau 5B

Le coefficient de détermination R^2 permet de connaître l'intensité de la relation unissant les 2 paramètres x et y . La valeur de R^2 obtenue dans le cas présent est égale à 0,975. Cela rend compte d'une forte proximité des points autour de la droite de régression (il y a peu d'écarts à la linéarité). En ramenant cette valeur en pourcentage, il est possible d'interpréter les résultats comme suit : 97,5% de la variance du rapport des signaux RR/lec sont expliqués par la variation du pourcentage en OGM.

La nature exponentielle du processus d'amplification PCR implique que l'échelle des abscisses (% en OGM) soit représentée de manière logarithmique (Sakai *et al.*, 2002).

Une pente de 0,2634 est déterminée sur base de l'équation de la droite de régression. Cette première peut être définie comme un facteur de variation de l'ordonnée par rapport à l'abscisse ou, dans le cas présent, comme un facteur de variation du rapport RR/lec par rapport au logarithme népérien de la teneur en OGM. Pour une même variation dans le pourcentage en OGM, au plus la valeur de la pente est élevée, au plus une variation importante devra être mesurée pour le rapport RR/lec, et au plus cela apporte de précision au test. La valeur de la pente de la droite de régression présentée à la Figure 19 peut être exprimée comme suit : un doublement de la teneur en OGM dans un échantillon contenant entre 0,1 et 5% d'OGM correspond à une augmentation du rapport des signaux RR/lec de 0,1825.

Il semblerait, en conclusion, que cette approche particulière de PCR compétitive entre l'OGM et la plante puisse être favorable à la quantification des transgènes dans une matrice alimentaire. D'autres manipulations présentées par la suite ont néanmoins été réalisées pour la confirmation des résultats obtenus.

III.3. DETERMINATION DES RAPPORTS NOMBRE D'AMPLICONS RR /NOMBRE D'AMPLICONS LECTINE

Dans le but de s'assurer que la proximité des intensités mesurées pour les amplicons lec et RR est bien le résultat d'une meilleure efficacité d'hybridation des amplicons sur les sondes de capture RR que sur les sondes lec, il serait nécessaire de garantir qu'après les 40 cycles d'amplifications, les amplicons lec sont bien présents dans le produit PCR en plus grande quantité que les amplicons RR.

III.3.a. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les amplicons lec et RR générés avec les amorces 'Bipartites' PPHlec_{a-b} et PPHrr_{a-b} ainsi qu'avec les amorces PPHead possèdent respectivement une taille de 118 et 122 paires de bases. La faible différence de taille (4 paires de bases de différence) les rend non discernables sur un gel d'agarose. Le test suivant a donc été effectué (Figure 20).

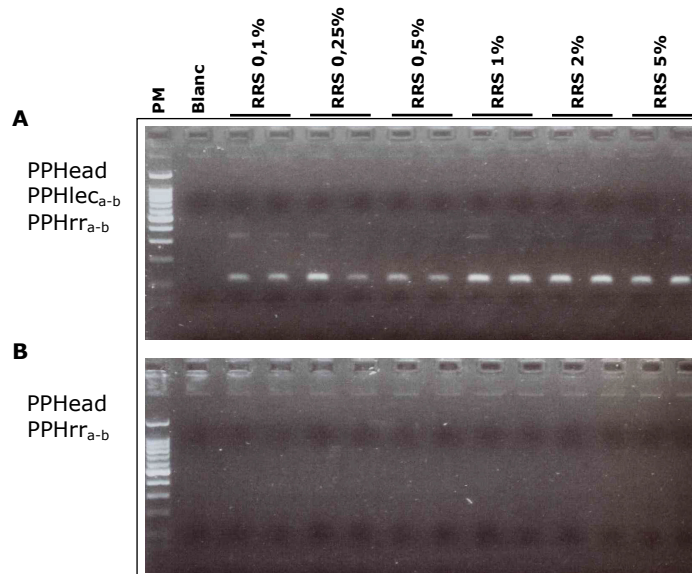


Figure 20. Une amplification de 40 cycles a été effectuée pour différents échantillons d'ADN à teneurs diverses en OGM et pour deux types de solution PCR : une première contenant les deux paires d'amorces 'Bipartites' (0,05 μ M) ainsi que l'amorce 'Head' (1 μ M) (Figure A), une seconde contenant les amorces 'Bipartites' PPHrr_{a-b} (pour le gène RRS) et l'amorce universelle 'Head' (Figure B). Les produits PCR obtenus ont ensuite été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose.

Les bandes observables à la Figure 20A pour les différentes concentrations en OGM correspondent aux amplicons lec et RR générés grâce aux différentes amorces présentes dans la solution PCR. Ces bandes ne sont plus observables sur la Figure 20B où seuls des amplicons RR auraient pu être observés.

Afin de confirmer la présence d'amplicons RR sur Figure 20B, un produit PCR biotinylé pour chacune des deux conditions testées a été hybridé sur damier (Figure 21).

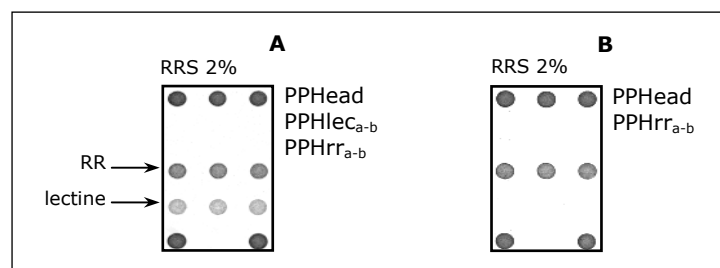


Figure 21. Hybridation sur damier des produits PCR biotinylés obtenus pour les deux conditions préalablement décrites (A et B), et correspondant à échantillon d'ADN à 2% en RRS.

Pour la solution PCR contenant les deux paires d'amorces 'Bipartites' et l'amorce 'Head', les deux types d'amplicons ont pu être détectés sur damier (Figure A). Les spots mis en évidence sur damier de la Figure 21B correspondent aux amplicons RR, malgré que ceux-ci n'aient pu être observés sur gel d'agarose (Figure 20B).

On peut conclure de ces résultats que les bandes visibles à la Figure 20A sont en grande partie constituées par des amplicons lec. On peut donc affirmer qu'après les 40 cycles d'amplification, les amplicons lec sont en quantité plus importante que les amplicons RR.

III.3.b. Micro-électrophorèse capillaire

Le recours à la technologie de micro-électrophorèse capillaire pourrait permettre de faire la distinction entre les deux amplicons lec et RR non différenciables sur un simple gel d'agarose ainsi que de quantifier leurs abondances. Le kit DNA 1000 labchip permettant d'obtenir une résolution de ± 5 paires de bases dans une gamme de taille allant de 25 à 100 paires de bases est utilisé pour distinguer ces deux types d'amplicons.

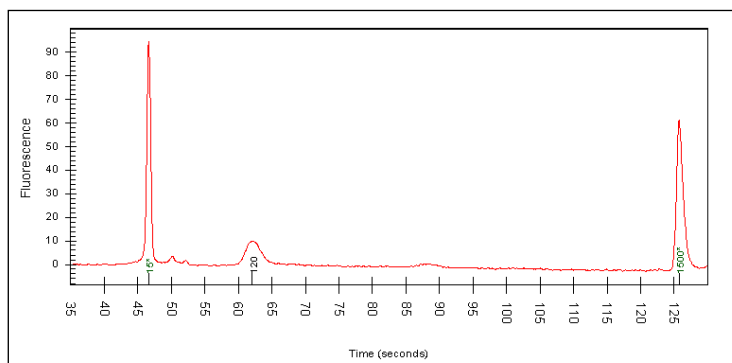


Figure 22. Résultat généré avec le kit DNA 1000 labchip, et appliqué à la détection des amplicons lec et RR obtenus après 40 cycles de PCR réalisés sur 50ng d'ADN extrait d'une farine de référence à 5% en RRS. Les pics à 15 et 1500 paires de bases correspondent à des marqueurs de poids moléculaires servant de références. Ce test a été effectué sur les six produits PCR correspondant aux différents échantillons d'ADN à teneurs diverses en OGM (résultats non présentés)

Le seul pic observé estimé à 120 paires de bases correspond à la fois aux amplicons lec et RR dont les 4 paires de bases de différence ne sont pas suffisantes pour permettre une discrimination de ces amplicons.

Un profil identique a été obtenu pour un même test réalisé sur des produits PCR ayant été soumis à une restriction totale par l'enzyme Bgl II ne clivant que les amplicons RR (résultats non présentés). Remarquons qu'il n'a pas été possible de quantifier les deux types d'amplicons vu la faible intensité des pics obtenus. En fait, aucun pic n'a été détecté pour les deux fragments RR obtenus après restriction et le seul pic observé à 120 paires de bases correspondait aux amplicons lec. Une troisième expérience impliquant la concentration des échantillons au 'speedvac' (après restriction des produits PCR) a donc été réalisée. Cependant, la forte concentration saline résultant de la concentration de l'échantillon au 'speedvac' a empêché la micro-électrophorèse capillaire de se dérouler normalement. D'autres expériences auraient pu être réalisées dans le but de se débarrasser des sels : les amplicons auraient pu être extraits à partir d'un gel d'agarose (de manière à se débarrasser des sels présent dans la solution PCR) avant la concentration et la restriction enzymatique. Le produit obtenu aurait alors pu être soumis à une microélectrophorèse capillaire. Cependant, les résultats obtenus nous suffisent pour conclure que le pic observé à 120 paires de bases sur la Figure 22 est principalement généré par les amplicons lec.

Les fortes intensités obtenues pour les spots RR par rapport à celles générées avec les spots de la lectine sont donc bien dues à une différence dans les efficacités d'hybridation des amplifications sur les deux types de sondes de capture.

III.4. ETABLISSEMENT D'UNE DROITE DE CALIBRATION AU MOYEN D'UN PLUS GRAND NOMBRE D'ECHANTILLONS

Un test identique à celui présenté au paragraphe III.2 est appliqué à un nombre plus élevé d'échantillons à teneurs diverses en soja transgénique. Afin de renouveler l'expérience de PCR compétitive avec les paramètres préalablement utilisés, différentes dilutions sont faites

sur base d'échantillons d'ADN à 0 et 5% en RRS. La marche à suivre utilisée est identique à celle présentée au paragraphe III.2, et la droite de calibration obtenue est présentée ci-dessous (Figure 23).

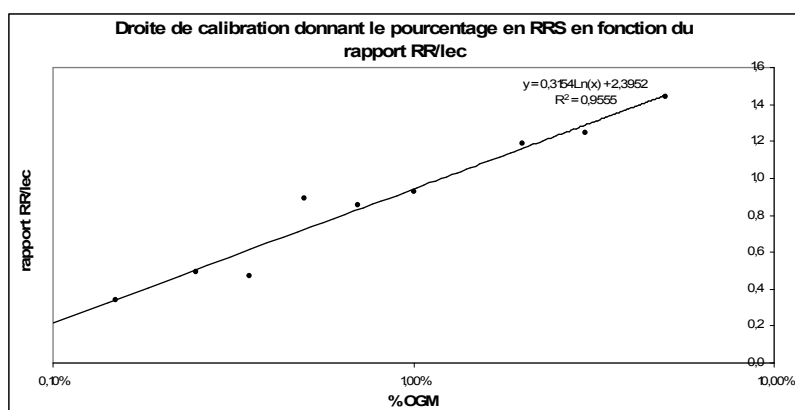


Figure 23. Droite de calibration établie grâce à différents échantillons d'ADN à contenus divers en OGM. Ceux-ci sont obtenus par dilution d'un échantillon dont la teneur en transgène est de 5% en RRS dans un échantillon à 0% en RRS. Les différentes teneurs en transgène des échantillons d'ADN utilisés sont les suivantes : 0,15-0,25-0,35-0,50-0,70-1-2-3 et 5% en RRS

Cette seconde droite de calibration possédant un coefficient de détermination de 0,95 et une pente de 0,3154 confirme les résultats préalablement obtenus avec un plus faible nombre d'échantillons d'ADN.

III.5. TEST DE L'INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN AMORCES 'BIPARTITES'

L'expérience suivante a pour but de confirmer que les concentrations en amorces 'Bipartites' et 'Head' choisies, c'est-à-dire respectivement 0,05 et 1 μM , sont bien favorables à la mise en place d'une compétitivité entre les amplicons lec et RR pour les amorces 'Head'. Ceci est réalisé en faisant varier la concentration en amorces 'Bipartites' et en établissant les droites de calibrations correspondantes (Figure 24).

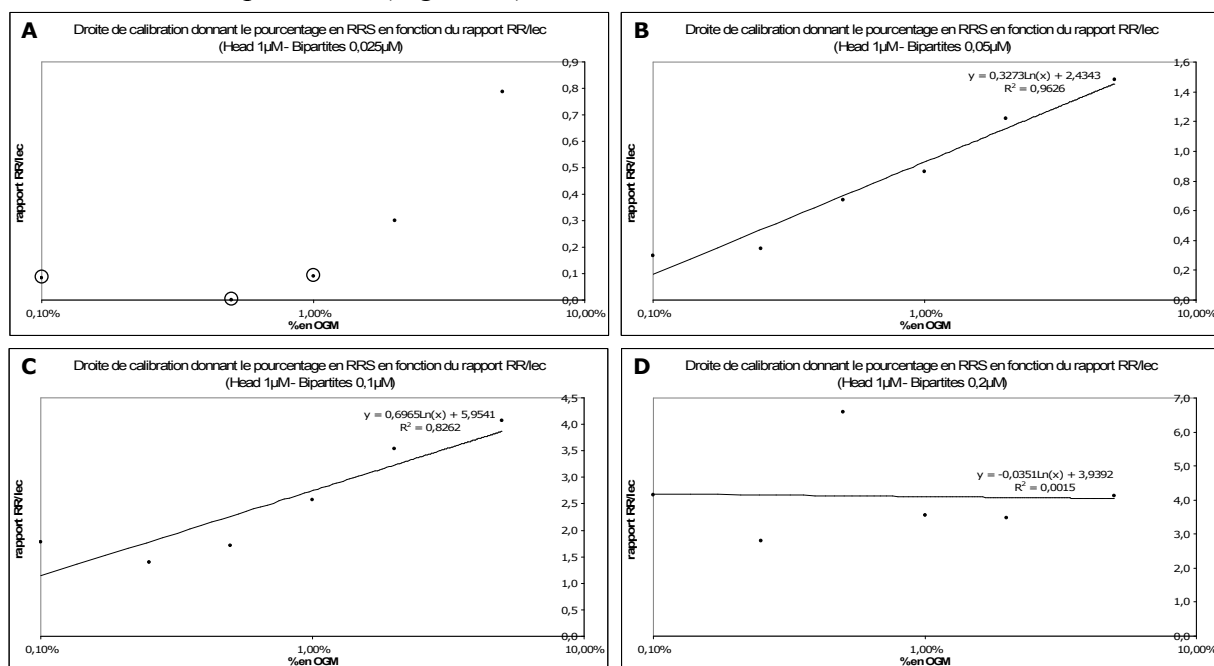


Figure 24. Droites de calibration obtenues pour différentes valeurs de concentration en amorces Bipartites (0,025-0,05-0,1 et 0,2 μM) mais pour une même concentration en Head (1 μM). Les autres paramètres de PCR compétitive étant identiques à ceux utilisés au préalable.

Le premier graphe (Figure 24A), correspondant à des concentrations en amorces 'Head' et 'Bipartites' dont les valeurs sont respectivement de 1 et 0,025 μ M, présente un profil différent des autres. Du fait d'une trop faible concentration en amorces 'Bipartites', les amplicons primaires que ces amorces génèrent doivent se trouver en relativement faible quantité. Cela doit influencer de manière négative l'amplification réalisée par les amorces universelles, ces dernières ne pouvant s'hybrider que sur les amplicons primaires et les amplicons déjà issus des amorces 'Head'. En conséquence, les signaux d'hybridation RR obtenus sont trop faibles pour les résultats correspondant aux points allant de 0,1 à 1% en OGM. Ces points n'ont donc pas été pris en compte pour la mise au point d'une droite de calibration.

Le second graphe (Figure 24B) correspond aux conditions préalablement testées et dont les résultats sont présentés au paragraphe III.2. Les droites de calibration obtenues dans les deux cas sont similaires. Les mêmes conclusions en découlent : les conditions de PCR utilisées semblent propices à la mise en place d'une compétitivité entre les amplicons lec et RR pour les amorces 'Head'. Cette même compétitivité implique qu'une faible variation dans un des composants de la solution (par exemple des variations légères au niveau des quantités en amorces ou en sels) ou la présence d'un inhibiteur de PCR se répercutera d'une manière similaire sur l'amplification des différents types d'amplicons. Le rapport final des nombres d'amplicons RR et lec restera de ce fait identique à celui obtenu dans des conditions normales de PCR. Les droites de calibration mises au point dans de telles conditions devront dès lors posséder un coefficient de détermination proche de l'unité, ce qui a pu être observé jusqu'à présent.

Le troisième graphe (Figure 24C) peut être interprété de la manière suivante. Dans le cas où la concentration en amorces 'Bipartites' devient trop importante, de faibles variabilités dans les paramètres de PCR telles que celles citées précédemment pourraient induire des modifications relativement importantes des rapports des nombres d'amplicons RR et lec. Dans de telles conditions, la répartition des points autour de la droite de régression est plus diffuse et les coefficients de détermination établis sont par conséquent plus faibles. On observe cela pour les conditions 'Head' 1 μ M et 'Bipartites' 0,1 (Figure 24C).

Le plus faible coefficient de détermination de cette droite C implique que celle-ci est moins propice à être utilisée comme droite de calibration donnant le pourcentage en OGM sur base du rapport des signaux RR/lec mesurés.

La quatrième droite (Figure 24D) ne montre plus de relation claire entre les quantités d'amplicons RR et le pourcentage en OGM. Il est probable que la compétition ne joue plus et que le niveau d'amplicons RR soit devenu trop élevé, même aux faibles quantités en OGM.

Les conditions expérimentales utilisées pour la droite de calibration B semblent en conclusion être les plus favorables au déroulement de la PCR compétitive quantitative : amorces 'Bipartites' et 'Head' en concentrations respectives de 0,05 et 0,1 μ M.

III.6. ETUDE DE L'INFLUENCE DU NOMBRE DE CYCLES D'AMPLIFICATION PCR

Deux tests supplémentaires sont réalisés afin d'étudier l'influence du nombre de cycles PCR ainsi que la concentration en ADN génomique ajoutée à la solution PCR sur le déroulement de cette PCR.

Dans le protocole mis au point, le nombre de cycles PCR a été fixé à 40. Le test qui suit a pour but d'étudier l'influence du nombre de cycles d'amplification sur les rapports des signaux RR/lec. L'amplification est stoppée après 30, 35 et 40 cycles et les produits sont hybridés sur chips, détectés, et enfin quantifiés. Les droites de calibration obtenues sont présentées à la Figure 25.

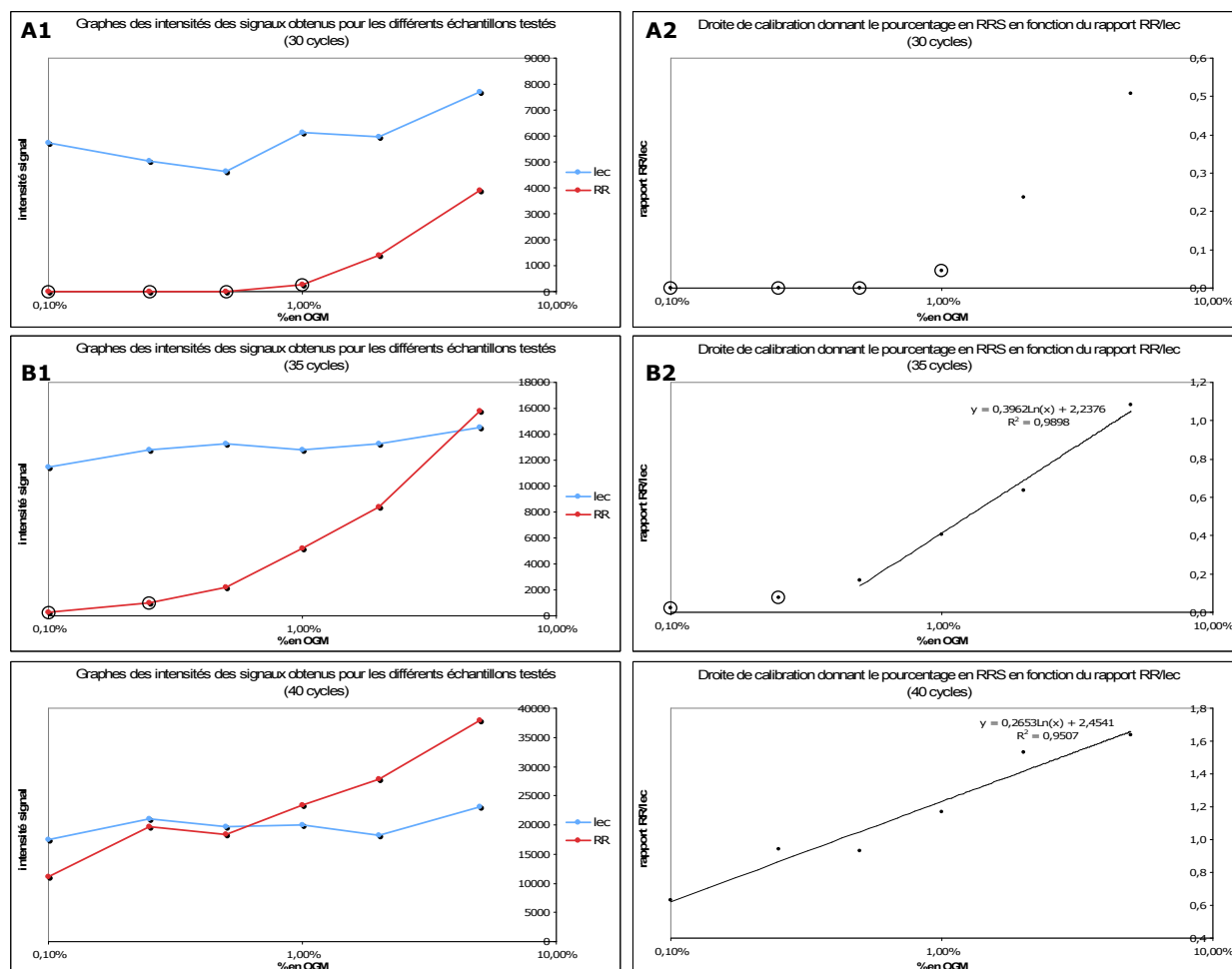


Figure 25. Graphes des signaux lec et RR et droites de calibration obtenus après A : 30 cycles, B : 35 cycles et C : 40 cycles.

On remarque que, contrairement à ce qui a été observé par Alexandre et associés en 1998, la mise au point des droites de calibration semble être influencée par le nombre de cycles PCR, ce qui indique que la compétitivité n'est pas parfaite entre la gène standard et le transgène (Alexandre *et al.*, 1998). On aurait pu s'attendre à de tels résultats. En effet, l'approche de PCR compétitive quantitative développée au cours de ce mémoire ne se base pas sur l'utilisation de standards internes comme dans le cas de la PCR compétitive traditionnelle. Il s'agit dans le cas présent d'une PCR dans laquelle les différentes séquences à amplifier entrent en compétition pour l'amorce universelle 'Head'. Dans la PCR compétitive traditionnelle, le standard interne est une séquence nucléotidique amplifiée avec les mêmes amorces que la séquence d'intérêt et possédant une forte homologie avec cette séquence d'intérêt. Cela permet non seulement aux deux séquences d'être amplifiées avec une même efficacité et d'assurer que ces amplifications soient affectées de la même manière suite à une anomalie durant la PCR, mais cela assure également la conservation des rapports de nombres d'amplicons, malgré une variation du nombre de cycle PCR.

Malgré la mise en évidence d'une influence du nombre de cycles PCR sur les rapports RR/lec obtenus, une droite de calibration avec de faibles écarts à la linéarité a pu être déterminée pour les conditions 35 et 40 cycles (graphes B et C). Contrairement à la condition C (40 cycles d'amplification PCR), la condition B (35 cycles) ne permet pas d'obtenir pour tous les échantillons à teneurs diverses en OGM des signaux RR suffisants. En effet, pour cette même condition, les rapports RR/lec correspondant aux farines à 0,1 et 0,25% ne peuvent pas être pris en compte pour l'élaboration de la droite de calibration. Aucune droite de calibration ne peut être déterminée pour la condition A (30 cycles) car les signaux obtenus pour les spots RR des échantillons allant de 0,1 à 1% en OGM sont également trop faibles (graphes A).

En conclusion, il semble qu'il soit nécessaire de réaliser entre 35 et 40 cycles d'amplification PCR pour permettre l'obtention, sur damier, de signaux RR et lec suffisamment intenses pour qu'ils puissent être utilisés pour la mise au point d'une droite de calibration.

III.7. ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA QUANTITE INITIALE D'ADN GENOMIQUE DANS LA SOLUTION PCR

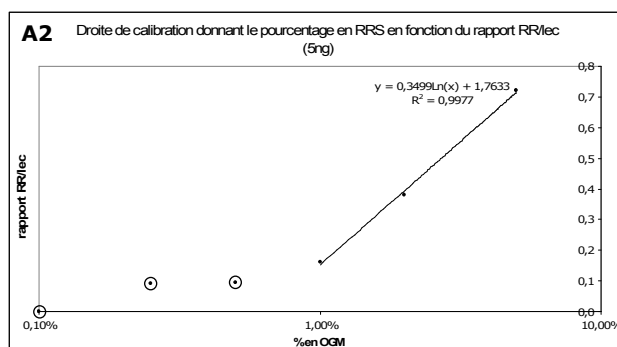
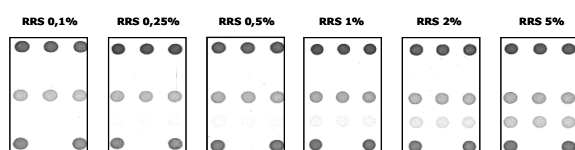
Trois quantités différentes en ADN extrait de farines de références ont été testées : 5, 20 et 50ng. Le tableau suivant (Tableau 7) illustre les nombres de molécules d'ADN correspondant aux quantités utilisées :

quantité d'ADN	%RRS	nombre de copies de lec	nombre de copies de RR
5 ng	0,1	4400	4,4
	0,25	4400	11
	0,5	4400	22
	1	4400	44
	2	4400	88
	5	4400	220
20 ng	0,1	17600	17,6
	0,25	17600	44
	0,5	17600	88
	1	17600	176
	2	17600	352
	5	17600	880
50 ng	0,1	44000	44
	0,25	44000	110
	0,5	44000	220
	1	44000	440
	2	44000	880
	5	44000	2200

Tableau 7. Conversion approximative des quantités d'ADN en nombre de copies de lectine et de RR. Dans le cas du RRS, 100ng d'ADN équivalent à environ à 88000 copies de lectine.

A l'exception de la quantité d'ADN génomique ajouté à la solution, les paramètres de PCR sont identiques à ceux présentés au Tableau 5. La Figure 26 ci-dessous correspond aux résultats d'hybridation numérisés ainsi qu'aux droites de calibration déterminées pour chacune des trois quantités testées.

A1



B1

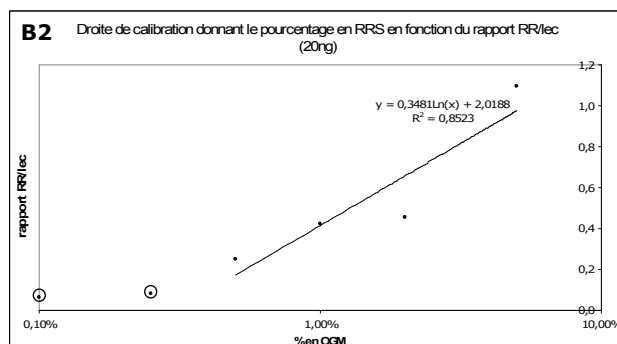
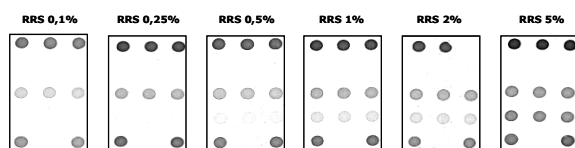


Figure 26. Damiers numérisés et droites de calibration correspondant à 5 et 20ng d'ADN inclus à la solution PCR (la suite de la Figure 26 est présentée à la page 22).

C1

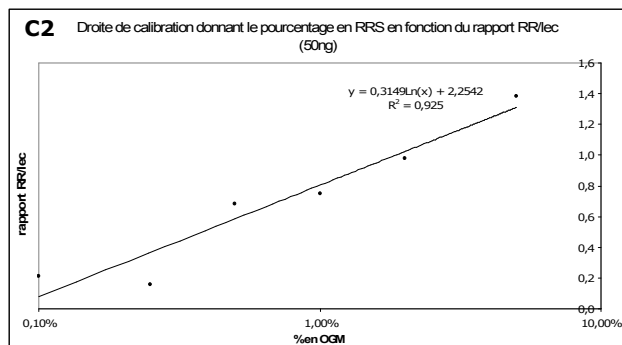
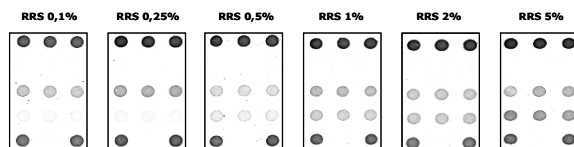


Figure 26 (suite). Damiers numérisés et droites de calibration correspondant à 50ng d'ADN inclus à la solution PCR

Pour chacune des trois conditions testées, une droite de calibration avec un coefficient de détermination élevé a pu être dressée. On peut remarquer que les différentes droites tracées présentent des pentes relativement similaires. Cela est d'autant plus frappant lorsque les différentes droites sont représentées sur un unique graphique (Figure 27).

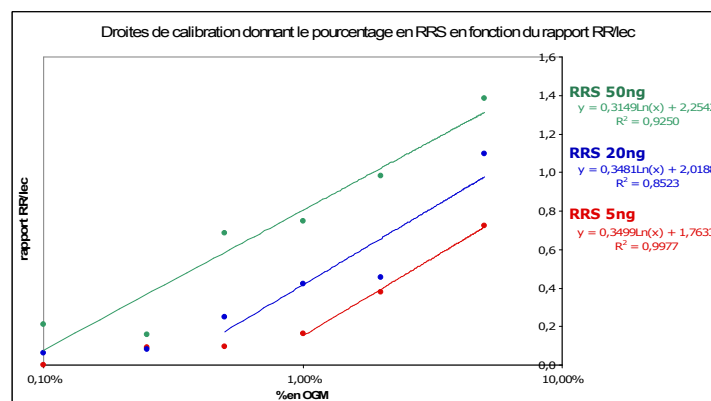


Figure 27. Droites de calibration obtenues pour les trois concentrations en ADN génomique ajoutées à la solution PCR

Ici encore les résultats sont cohérents dans la mesure où l'on considère que la PCR mise au point ne correspond pas à une PCR compétitive traditionnelle, mais bien à une PCR dans laquelle les séquences amplifiées entrent en compétition uniquement pour les amorces universelles. Ainsi, contrairement à une PCR compétitive pure avec laquelle les droites de calibration des différentes conditions se superposeraient, celles obtenues dans le cas présent possèdent une pente identique, mais sont décalées en fonction du pourcentage en OGM. Cela semble être dû au fait que, suite à une augmentation de la quantité en ADN génomique, le signal du RR augmente considérablement par rapport à celui de la lectine, qui reste relativement identique. Une augmentation de la quantité d'ADN ajouté à la solution PCR se traduit donc par des rapports des signaux RR/lec plus importants. On peut, par ailleurs, noter que le décalage des droites de calibration semble être proportionnel à la quantité d'ADN ajouté.

On peut conclure de cette expérience qu'une quantité de 50ng en ADN génomique est nécessaire pour l'obtention sur damier, après 40 cycles d'amplification PCR, de signaux lec et RR suffisamment intenses. Les rapports RR/lec correspondant à de tels signaux peuvent alors servir à tracer une droite de calibration donnant le pourcentage en OGM en fonction du rapport déterminé.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce mémoire a été la mise au point d'une Biochips permettant la détection et la quantification du soja transgénique Roundup Ready présent dans un échantillon d'ADN. Plusieurs méthodes de quantification d'OGM sont actuellement développées au sein du laboratoire. Ce mémoire a porté sur le développement d'une méthode n'ayant jusqu'à présent pas été évaluée. Il s'agit plus précisément d'une méthode de PCR compétitive entre la séquence du soja Roundup Ready et la séquence nucléotidique de la lectine du soja. L'idée générale est d'amplifier les séquences de la lectine et du RRS avec une unique amorce. De cette manière, certaines modifications involontaires des paramètres de PCR ou la présence d'un inhibiteur de PCR se répercuteraient de manière identique sur l'amplification des deux séquences amplifiées et les rapports des intensités RR/lec mesurées sur damiers n'en seraient dès lors pas modifiés. Cela a permis en fin de compte de dresser une droite de calibration donnant le pourcentage en RRS en fonction du rapport des signaux RR/lec détectés sur la Biochips.

Afin de mettre en place une compétition entre les séquences lec et RR pour une même amorce, des amorces particulières appelées 'Bipartites' ont dû être mises au point. Celles-ci comportent une partie s'hybridant de manière spécifique sur le segment d'ADN à amplifier. Une seconde partie, toujours constante, est elle-même spécifique à une autre amorce : l'amorce 'Head'. Un faible nombre de cycles d'amplification avec les deux paires d'amorces 'Bipartites', spécifiques à la séquence lec et à la séquence RR, vont permettre l'obtention d'amplicons primaires. Après s'être débarrassé des amorces 'Bipartites', les amplicons primaires pourront être amplifiés avec l'amorce 'Head' de manière compétitive.

Il a donc été nécessaire, dans un premier temps, de mettre au point les séquences de ces amorces 'Bipartites' et 'Head'. Elles ont été sélectionnées afin d'amplifier de manière spécifique les séquences d'intérêt. Elles ont également été choisies sur base de leur incapacité à former des structures secondaires trop stables.

Après réalisation de quelques cycles d'amplification des séquences lec et RR avec les 2 couples d'amorces 'Bipartites', il devient nécessaire de remplacer ces amorces 'Bipartites' par l'amorce universelle. Rudi et collaborateurs ont décrit une méthode pour y parvenir (Rudi et al., 2003). Selon eux, le recours à une exonucléase I et à une phosphatase alcaline permettrait de se débarrasser des amorces et des dNTP en excès présents dans la solution PCR. Ces deux enzymes seraient alors inactivées à la chaleur. Le produit obtenu serait ajouté à une nouvelle solution PCR contenant l'amorce universelle 'Head' pour la réalisation d'un plus grand nombre de cycles de PCR compétitive. Cette méthode a été appliquée au cas du RRS et de la lectine selon les paramètres décrits par Rudi et associés. Aucun résultat n'a été obtenu. Afin d'isoler la cause du problème, une série de manipulations ont été entreprises.

Des tests de fonctionnalité des deux types d'amorces 'Bipartites' et 'Head' ont donné des résultats positifs quant à leur capacité à amplifier les séquences d'intérêt. La possibilité a alors été envisagée que les enzymes exo I et SAP ou un inhibiteur de PCR présent dans la solution d'enzymes n'aient pas été inactivés. Suite à la réalisation de différents tests, nous avons pu conclure que la cause des problèmes préalablement rencontrés devait être la présence d'un inhibiteur de PCR encore actif lors de la réalisation de la seconde étape d'amplification.

Une autre approche de PCR compétitive a donc été étudiée. Elle se base également sur l'utilisation des amorces 'Bipartites' et 'Head' déjà mises au point. Elle consiste en l'amplification simultanée des séquences lec et RR grâce aux amorces 'Bipartites' et 'Head'

présentes dans un même tube. La quantité d'amorces 'Bipartites' ajoutée à la solution PCR a été réduite de manière à ne permettre l'amplification des séquences cibles que durant les premiers cycles de PCR. Les amorces 'Head' pourront alors prendre le relais pour permettre l'amplification compétitive des deux séquences d'intérêt.

En fixant la quantité d'ADN génomique à 50ng, le nombre de cycles d'amplification à 40 et la concentration en amorce 'Head' à 1 μ M, une étude sur gel d'agarose de la concentration minimale en amorce 'Bipartites' à inclure à la solution a été réalisée. Il apparaît qu'une concentration de 0,05 μ M est nécessaire pour l'obtention, en fin de PCR, d'une quantité appréciable d'amplicons à hybrider sur chips.

Différents échantillons d'ADN à teneurs diverses en OGM ont été amplifiés suivant les paramètres préalablement décrits. Les produits PCR biotinylés obtenus ont été hybridés sur des Biochips possédant les contrôles de fixation et d'hybridation appropriés, ainsi que des sondes de capture pour les séquences lec et RR. Après révélation des résultats, les signaux lec et RR obtenus pour les différents échantillons d'ADN ont permis l'établissement d'une droite de calibration qui met en corrélation le logarithme du pourcentage en OGM et le rapport RR/lec mesuré. La valeur élevée du coefficient de détermination de cette droite de calibration suggère que cette approche particulière de PCR compétitive entre l'OGM et la plante est une méthode adaptée à la quantification des transgènes dans une matrice alimentaire. Différentes manipulations ont néanmoins été réalisées afin de comprendre l'influence des diverses variables sur les résultats.

Pour vérifier l'influence de la quantité d'amorces 'Bipartites' sur les résultats obtenus après hybridation, quatre concentrations différentes en ces amorces ont été testées. Il apparaît que des concentrations en amorces 'Bipartites' et 'Head' de respectivement 0,05 et 1 μ M, sont les plus favorables à la mise en place d'une PCR compétitive quantitative.

Les deux derniers tests réalisés ont eu pour but d'étudier l'influence du nombre de cycles d'amplification PCR et de la quantité d'ADN ajoutée à la solution PCR sur les rapports des signaux RR/lec déterminés sur damiers. Nous avons conclu de ces deux expériences que, d'une part, la réalisation d'une amplification de 40 cycles et, d'autre part, une quantité d'ADN génomique de 50ng, sont les paramètres les plus adéquats, par rapport aux autres conditions testées, pour la mise au point de la droite de calibration recherchée.

Nous pouvons donc conclure que sous des conditions de PCR fixes (PPHlec_{a-b} 0,05 μ M, 40 cycles, 50ng d'ADN), la méthode de PCR compétitive mise au point et associée à la technologie des Biochips peut être utilisée pour la détermination de la teneur en RRS présent dans un échantillon d'ADN.

Pratiquement, lors de la quantification de la teneur en RRS dans un extrait d'ADN issu d'un échantillon inconnu, le paramètre le plus difficile à contrôler sera la quantité d'ADN ajoutée à la solution PCR. En effet, on a remarqué que la droite de calibration se déplace en fonction de la quantité de matériel de départ. Afin de solutionner ce problème, il serait possible d'envisager l'amplification indépendante d'une troisième séquence, avec une nouvelle solution PCR contenant uniquement les amorces spécifiques à cette séquence. Les produits PCR biotinylés des deux amplifications seraient alors hybridés sur un unique damier présentant les sondes de captures spécifiques au RR, à la lectine et à cette nouvelle séquence. En se référant à une courbe standard préalablement mise au point, il serait possible, sur base de l'intensité des spots obtenus pour la nouvelle séquence, de déterminer la quantité d'ADN ajoutée à la solution PCR. La droite de calibration appropriée pourrait alors être utilisée pour la détermination de la teneur en transgène dans l'échantillon inconnu.

La faisabilité de cette méthode de quantification devra être évaluée indépendamment pour différents transgènes, avant d'envisager le développement d'une Biochips permettant la quantification de multiples OGM.

Au cours de ce mémoire, deux types d'approches ont été envisagées pour permettre, après quelques cycles de PCR avec les amorces 'Bipartites', de laisser place à l'amplification avec les amorces universelles 'Head'. L'article écrit par Brownie et associés fait référence à une troisième méthode pouvant être adaptée au but recherché (Brownie *et al.*, 1997). Les différentes amorces doivent alors être choisies de sorte que la température de fusion (T_m) de l'amorce 'Head' soit significativement supérieure à celles des amorces 'Bipartites'. Ainsi, après les quelques premiers cycles d'amplification PCR réalisés pour une solution contenant les différentes amorces, la température d'annealing serait augmentée de manière à permettre uniquement l'amplification avec les amorces 'Head'. Cette amplification dirigée par les amorces universelles serait d'autant favorisée que les amorces 'Head' se trouveraient ajoutées à la solution en quantité supérieure aux amorces 'Bipartites'.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol* **20**, 215-23 (2002).
- Alary, R., Gautier, M-F., Joudrier, P. La PCR quantitative en temps réel : application à la quantification des OGM. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **9**, 468-473 (2002).
- Alexandre, I. et al. Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Anal Biochem* **295**, 1-8 (2001).
- Alexandre, I. et al. Compact disc with both numeric and genomic information as DNA microarray platform. *Biotechniques* **33**, 435-6, 438-9 (2002).
- Alexandre, I. et al. Quantitative determination of CMV DNA using a combination of competitive PCR amplification and sandwich hybridization. *Biotechniques* **25**, 676-83 (1998).
- Allemand, J. F., Bensimon, D., Jullien, L., Bensimon, A. & Croquette, V. pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophys J* **73**, 2064-70 (1997).
- BATS. Genetically Modified (GM) Crops (Rapport disponible sur le site <http://www.bats.ch>). 1-10, 138-141 (2003).
- Berben, G., Janssen, E., Debode, F. Détection, identification et quantification des transgènes dans les aliments par amplification génique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **4**, 208-213 (2000).
- Brownie, J. et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR, *Nucleic Acids Research* **25**, 3235-41 (1997).
- Burton, G. R., Nagarajan, R., Peterson, C. A. & McGehee, R. E., Jr. Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* **329**, 167-85 (2004).
- Casse, F. Qui a peur des OGM? *La recherche* **327**, 26-44 (2000).
- Chen, J. J. et al. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* **51**, 313-24 (1998).
- Chen, Y., Dougherty, E., Bittner, M. Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA Microarray Images. *Journal of Biomedical Optics* **2**, 364-374 (1997).
- de la Riva, G. A., Gonzalez-Cabrera, J., Vazquez-Padron, R., Ayra-Pardo, C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* **1**, 119-133 (1998).
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J. & Klapper, P. E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* **13**, 559-70 (2000).
- Ernest, I. et al. Quantitative assay for group M (subtype A-H) and group O HIV-1 RNA detection in plasma. *J Virol Methods* **93**, 1-14 (2001).
- Fagan, J. et al. Performance Assessment Under Field Conditions of a Rapid Immunological Test for Transgenic Soybeans. *Journal of Food Science and Technology* (2001).
- Foultiers, B., Moreno-Hagelsieb, L., Flandre, D., Remacle, J. Comparison of DNA detection methods using nanoparticles and silver enhancement. *IEE Proceedings (Nanobiotechnology)* **152**, 3-12 (2005).
- Frewer, L. et al. Societal aspects of genetically modified foods. *Food Chem Toxicol* **42**, 1181-93 (2004).
- Fromm, M., Taylor, L. P. & Walbot, V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5824-8 (1985).
- Gelvin, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 16-37, table of contents (2003).
- Gianessi, L., Carpenter, J.E. Agricultural Biotechnology: Benefits of Transgenic Soybeans. *National Center for Food and Agricultural Policy* (2000).
- Global Knowledge Center on Crop Biotechnology. Cultures génétiquement modifiées et environnement (disponible sur le site <http://www.isaaa.org>) (2004).

GM Science Review Panel. An open review of the science relevant to GM crops and food based on the interests and concerns of the public (GM Science Review first report) (disponible sur le site <http://www.gmsciencedebate.org.uk>). *GM Science Review* (2003).

Godefroid, E. Les puces à ADN. *Chimie Nouvelle* **18**, 3113-20 (2000).

Greiner, R., Koietzny, U., Villavicencio, A. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control* **16**, 753-759 (2005).

Hamels, S. et al. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *Biotechniques* **31**, 1364-6, 1368, 1370-2 (2001).

Hansen, G. & Chilton, M. D. "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14978-83 (1996).

Hemmer, W. Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods. *BATS* (1997).

Holst-Jensen, A., Ronning, S. B., Lovseth, A. & Berdal, K. G. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem* **375**, 985-93 (2003).

Hubner, P., Studer, E., Luthy, J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control* **10**, 353-358 (1999).

James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: *ISAAA (International service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications)* **32** (2004).

Li, W., Drake, M. A. Development of a Quantitative Competitive PCR assay for detection and quantification of *Escherichia Coli* O157:H7 cells. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3291-94 (2001).

Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R. & Lockhart, D. J. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**, 20-4 (1999).

Medlin, J. Array of hope for gene technology. *Environ Health Perspect* **109**, A34-7 (2001).

Monsanto. Safety Assessment of Roundup Ready Soybean Event 40-3-2 (disponible sur le site <http://www.monsanto.com>). (2002).

Porschke, D. Elementary steps of base recognition and helix-coil transitions in nucleic acids. *Mol Biol Biochem Biophys* **24**, 191-218 (1977).

Provenzano, M., Rossi, C.R., Mocellin, S. The Usefulness of Quantitative Real-Time PCR in Immunogenetics. *The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI)*, 89-91 (2001).

Rajeevan, M. S., Dimulescu, I. M., Unger, E. R. & Vernon, S. D. Chemiluminescent analysis of gene expression on high-density filter arrays. *J Histochem Cytochem* **47**, 337-42 (1999).

Règlement (CE) N° 1830/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant la traçabilité et l'étiquetage des organismes génétiquement modifiés et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'organismes génétiquement modifiés, et modifiant la directive 2001/18/CE. *Journal officiel de l'Union Européenne* (2003).

Règlement (CE) N° 1829/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés. *Journal officiel de l'Union Européenne* (2003).

Remacle, J., Zammattéo, N., Alexandre, I., Moris, P. Les sondes à ADN, outils du futur. *Biofutur* **139**, 45-55 (1994).

Rogan, G. J. et al. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans. *Food Control* **10**, 407-414 (1999).

Rudi, K., Rud, I. & Holck, A. A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res* **31**, e62 (2003).

- Sakai, E., Mori, M., Nakagawara, K. Automated DNA isolation from genetically modified soybeans and soybean derived food. *Biochemica* **1**, 16-17 (2002).
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-70 (1995).
- Schena, M. et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10614-9 (1996).
- Slater, A., Scott, N. & Fowler, M. *Plant biotechnology* (ed. Press, Oxford University) Chapter 3 : Techniques for plant transformation, 55-77; Chapter 4 : Binary vectors for plant transformation 79-100 (2003).
- Snijders, A. M., Meijer, G. A., Brakenhoff, R. H., van den Brule, A. J. & van Diest, P. J. Microarray techniques in pathology: tool or toy? *Mol Pathol* **53**, 289-94 (2000).
- Southern, E., Mir, K. & Shchepinov, M. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* **21**, 5-9 (1999).
- Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. & Brignon, P. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J Agric Food Chem* **47**, 5261-6 (1999).
- Watanabe, T. et al. New qualitative detection methods of genetically modified potatoes. *Biol Pharm Bull* **27**, 1333-9 (2004).
- Watson, J. D. & Crick, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-8 (1953).
- Wetmur, J. G. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26**, 227-59 (1991).
- Windels, P. et al. Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. *European Food Research and Technology* **213**, 107-112 (2001).
- Wolcott, M. J. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin Microbiol Rev* **5**, 370-86 (1992).
- Xu, X., Li, et al. Rapid and reliable detection and identification of GM Events using multiplex PCR coupled with Oligonucleotide Microarray. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 3789-94 (2005).
- Zammatteo, N. et al. New chips for molecular biology and diagnostics. *Biotechnol Annu Rev* **8**, 85-101 (2002).
- Zammatteo, N. et al. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal Biochem* **280**, 143-50 (2000).
- Zammatteo, N. et al. DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clin Chem* **48**, 25-34 (2002).

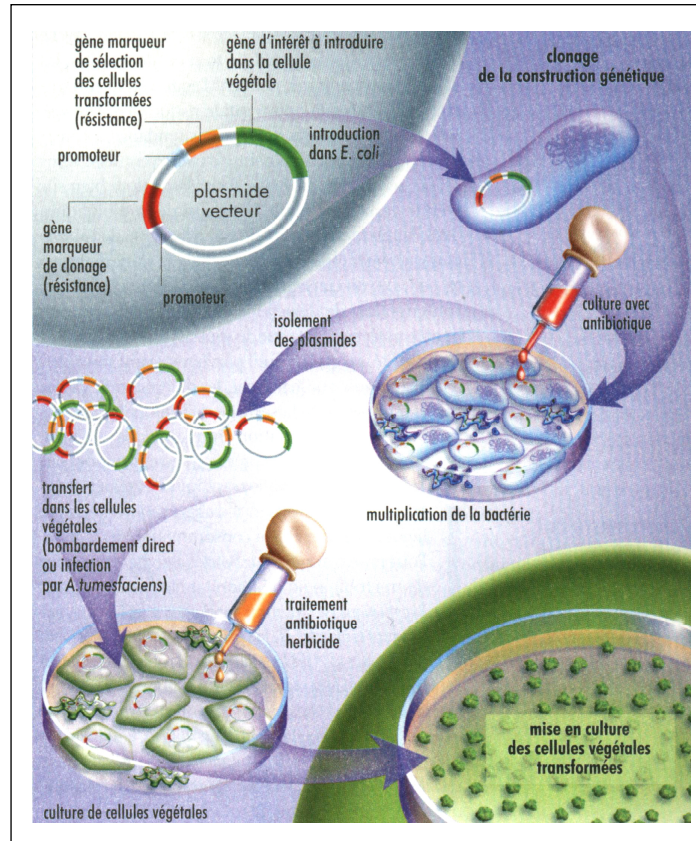


Figure I.2. Représentation schématique des principales étapes de la transgénèse végétale (Casse, 2000)

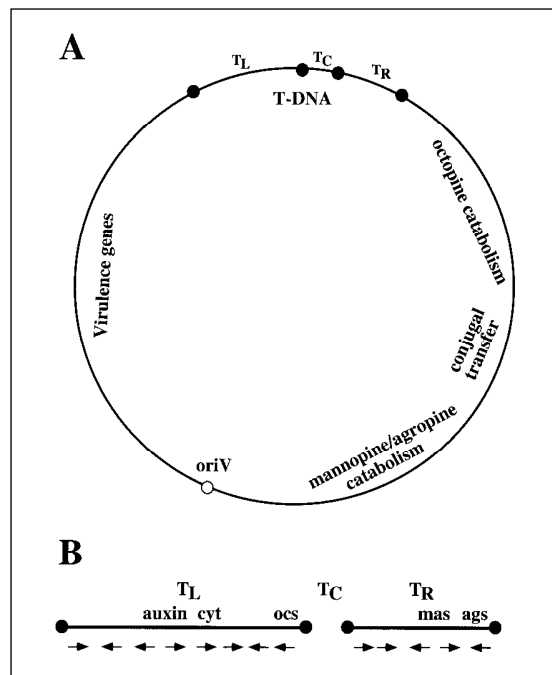


Figure I.3. A. Représentation schématique d'un plasmide Ti avec ses gènes de virulence et sa région T-DNA. B. La région T-DNA est elle-même divisée en trois sous-régions : TL TC et TR (pour T-DNA Left, Center et Right) encodant les enzymes responsables de la synthèse de l'auxine, des cytokinines et de plusieurs opines. (Gelvin *et al.*, 2003)

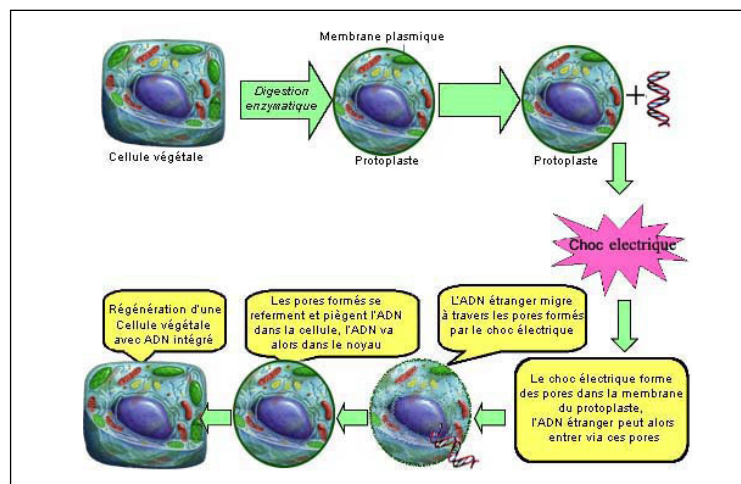


Figure I.4. Représentation schématique des étapes de transformation de cellules végétales par électroporation (<http://www.ogm-info.com>)

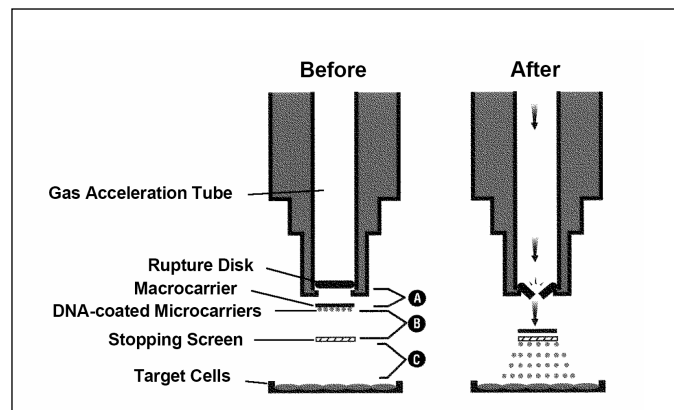


Figure I.5. Représentation schématique du fonctionnement de système Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (<http://www.Bio-Rad.com>)

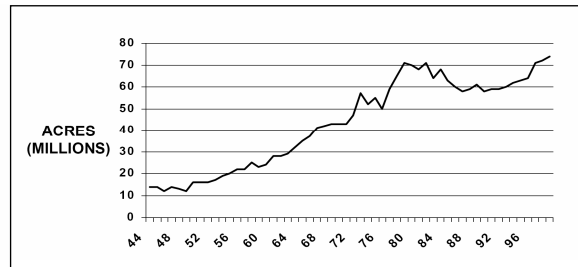


Figure I.6. Evolution des surfaces de culture consacrées au soja en Amérique depuis la seconde guerre mondiale (Gianessi *et al.*, 2000)

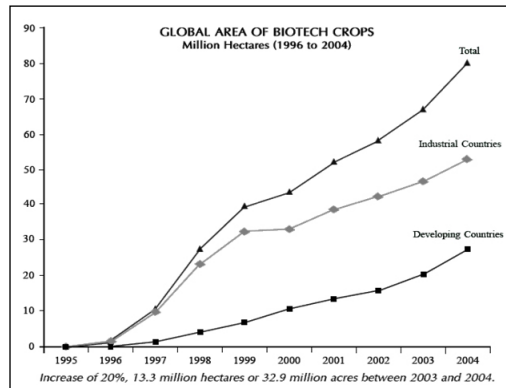


Figure I.7. Graphe de l'évolution de la superficie mondiale (en millions d'hectares) cultivée avec des plantes transgéniques entre 1995 et 2004 (James *et al.*, 2004).

	Million Hectares	% Biotech
Herbicide tolerant Soybean	48.4	60%
Bt Maize	11.2	14%
Bt Cotton	4.5	6%
Herbicide tolerant Maize	4.3	5%
Herbicide tolerant Canola	4.3	5%
Bt/Herbicide tolerant Maize	3.8	4%
Bt/Herbicide tolerant Cotton	3.0	4%
Herbicide tolerant Cotton	1.5	2%
TOTAL	81.0	100%

Figure I.8. Les principales cultures transgéniques dans le monde en 2004 : estimation des surfaces cultivées par les principales catégories de plantes transgéniques et leur proportion par rapport à l'entièreté des cultures transgéniques. Remarque : la mention Bt signifie 'résistant à des insectes' (Source : ISAAA : The International Service for the Acquisition of Agro-biotech Applications)

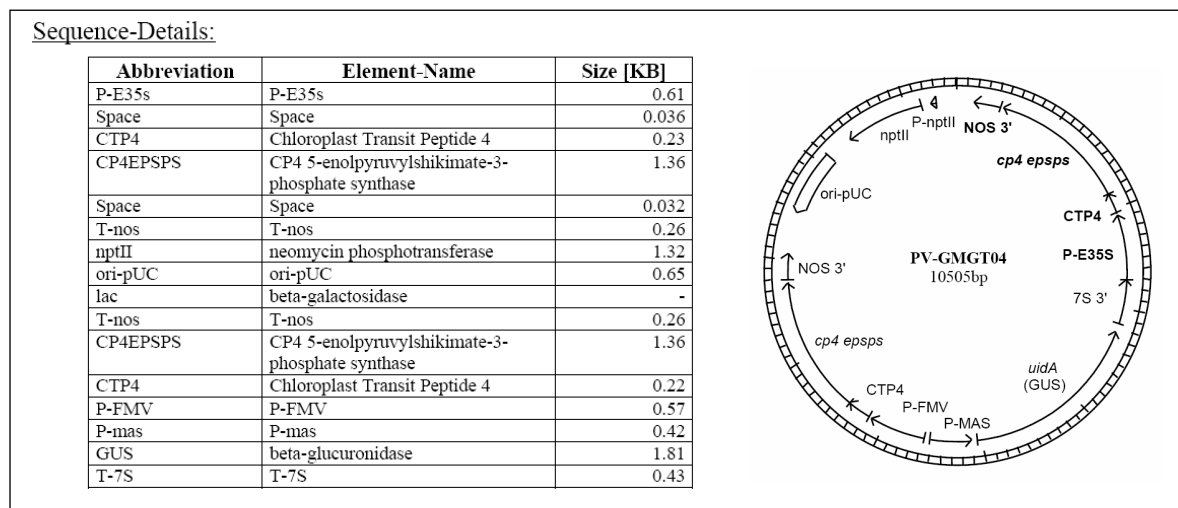


Figure I.9. Caractérisation moléculaire du vecteur PV-GMGT04 ayant servi à la fabrication du soja RR : Le soja Roudup Ready a été produit par la technique biolistique de transformation de la lignée parentale de soja non transgénique A5403 à l'aide du plasmide PV-GMGT04. Celui-ci contient le promoteur *E35S* du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), la séquence codante *CP4 EPSPS* fusionnée à une séquence codant pour un peptide de transition vers le chloroplaste (CTP4) et le terminateur *NOS3'*. Le peptide CTP4 permet de cibler la protéine CP4 EPSPS vers le chloroplaste, site de biosynthèse des acides aminés aromatiques (Source : Monsanto).

Seuls les 4 éléments *P-E35s* (ou du moins une portion), *CTP4*, *CP4EPSPS* et *T-NOS* (ou du moins une portion) ont été intégrés dans le génome du soja transgénique (Genetically Modified (GM) Crops, 2003)

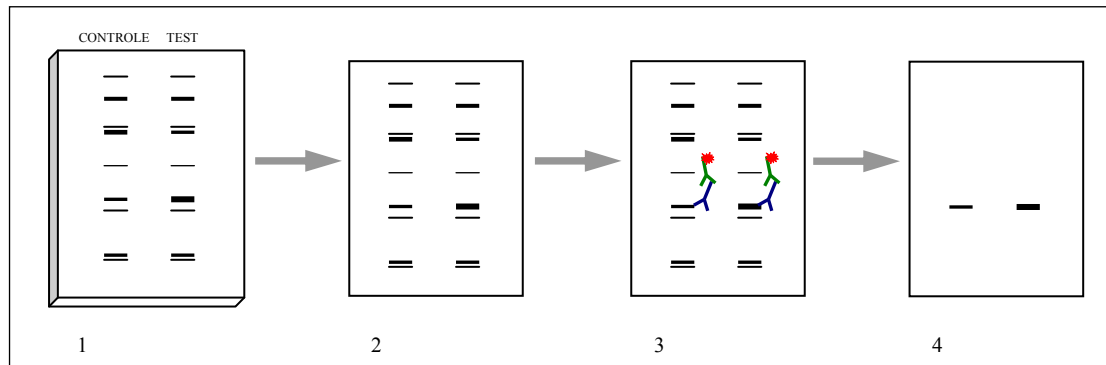


Figure II.10. Principe général du Western Blot :

1. séparation des protéines sur gel d'électrophorèse (généralement SDS-PAGE),
2. transfert du gel sur membrane (et blocage des sites de liaison non spécifiques),
3. incubation avec l'anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt ; lavages puis incubation avec l'anticorps secondaire couplé à un système de révélation (par exemple la horseradish peroxydase ou l'alcaline phosphatase),
4. lavages puis mise en évidence de la protéine d'intérêt par une méthode adaptée au type de système de révélation utilisé.

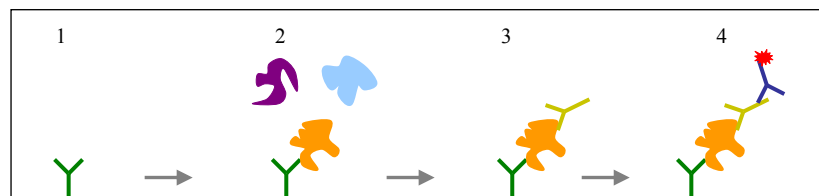


Figure II.11. Principe général de l'ELISA 'en sandwich' :

1. fixation de l'anticorps primaire n°1 sur le support,
2. lavages et ajout de l'extrait protéique contenant l'antigène à doser,
3. lavages et ajout de l'anticorps primaire n°2,
4. lavages, incubation avec l'anticorps secondaire couplé à un système de révélation, lavages et révélation.

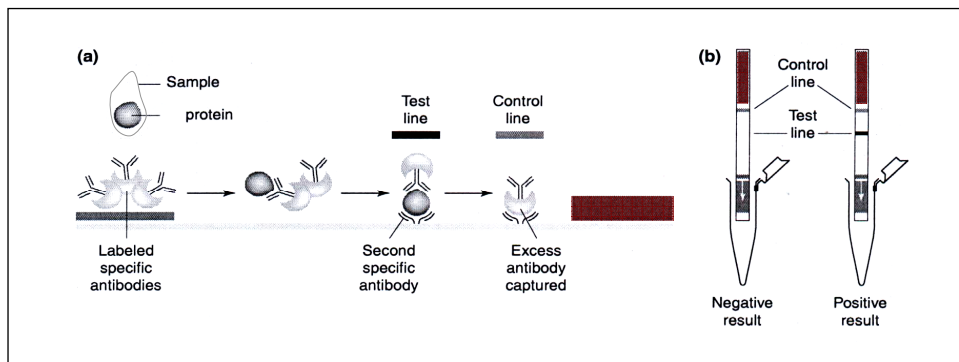


Figure II.12. Représentation schématique de la technologie des 'lateral flow strips' (Ahmed *et al.*, 2002)

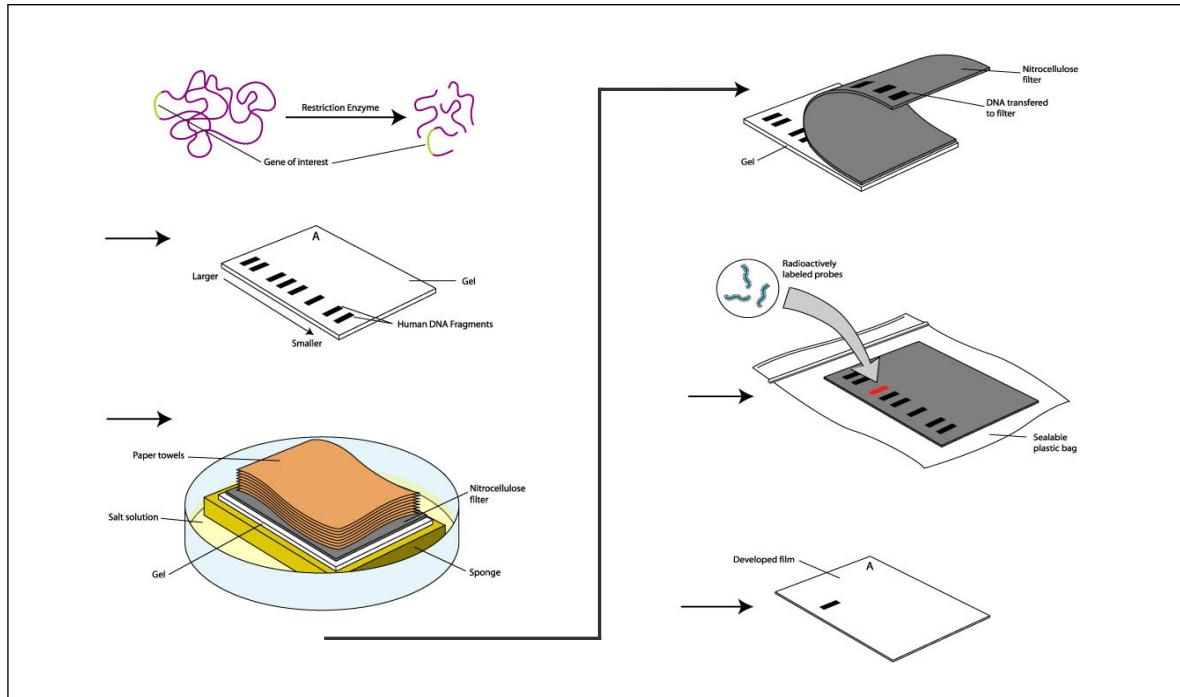


Figure II.13. Principe général du Southern Blot (<http://homepage.smc.edu/hgp/tools.htm>)

L'ADN à étudier est tout d'abord digéré par une enzyme de restriction adéquate. Les fragments générés sont ensuite séparés sur un gel d'électrophorèse. Une étape de dénaturation permet la séparation des deux brins d'ADN. Celui-ci est transféré sur membrane par un flux de liquide entraînant l'ADN. La membrane est ensuite incubée dans une solution contenant les sondes de capture simples brins couplées à un système de révélation. Une étape de révélation permet de mettre en évidence les bandes d'ADN dont la séquence est complémentaire à celle de la sonde. Dans le cas présent, le système de révélation utilisé est la radioactivité (par exemple à l'aide du radio-isotope ^{32}P). La révélation se fait alors par autoradiographie (la membrane est mise en contact avec un film photosensible).

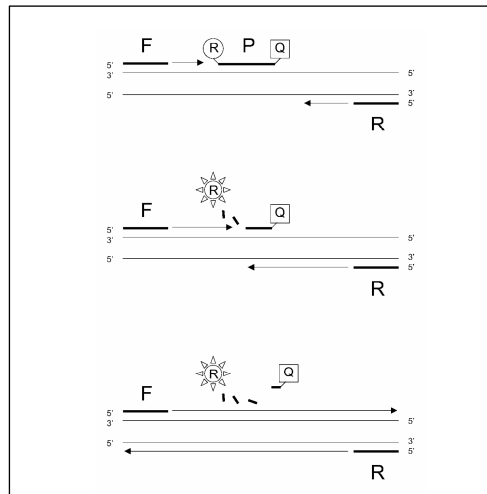


Figure II.14. Représentation schématique du principe de fonctionnement de la Real Time PCR avec utilisation d'une sonde Taqman comme fluorophore (Provenzano *et al.*, 2001).

Une sonde TaqMan est un oligonucléotide complémentaire de l'un des brins de la séquence cible, à laquelle elle s'hybride pendant la phase d'hybridation (ou d'annealing), de même que les amorces (F et R étant les amorces 'Forward' et 'Reverse', P étant la sonde (Probe)). Elle porte à son extrémité 5' une molécule fluorescente (fluorochrome) dite 'reporter' (R), et à son extrémité 3' une molécule appelée 'quencher' (Q). Le 'reporter' est une molécule qui, après excitation à une certaine longueur d'onde, émet un signal de fluorescence à une longueur d'onde spécifique qui est mesuré à la fin de chaque cycle de PCR. En absence d'amplification, la sonde reste intacte, la molécule 'quencher' inhibe en grande partie la fluorescence du 'reporter', et seule une fluorescence résiduelle est émise. En revanche, s'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN par l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase. Le 'reporter' est alors libéré et sa fluorescence n'est plus inhibée par le 'quencher'.

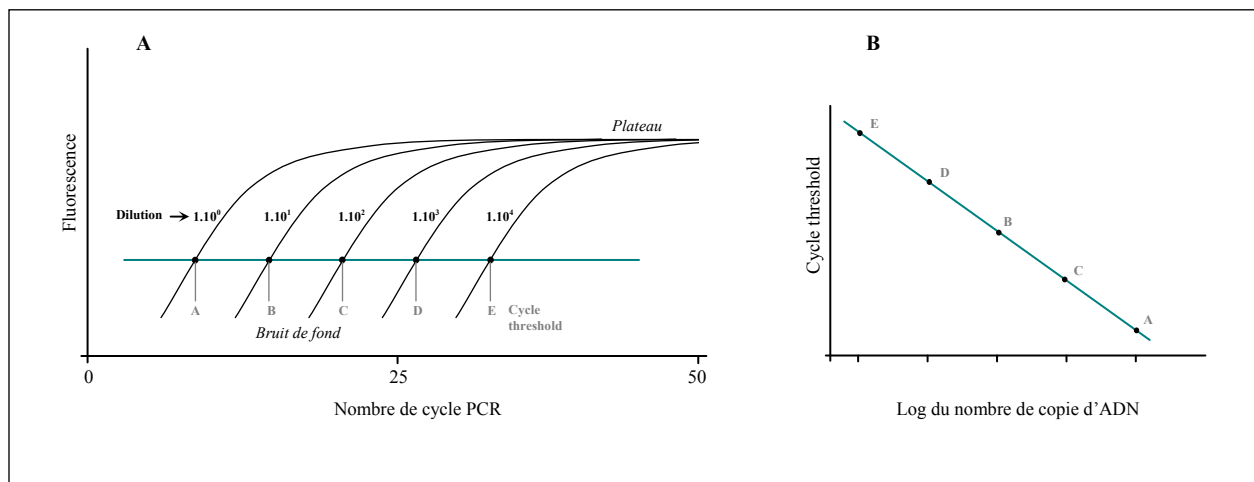


Figure II.15. A. Représentation schématique des courbes de Real-Time obtenues avec des dilutions de l'ADN à amplifier.

B. Droite de calibration donnant la quantité d'ADN initiale en fonction du Ct obtenu.
(D'après Vaitilingom *et al.*, 1999)

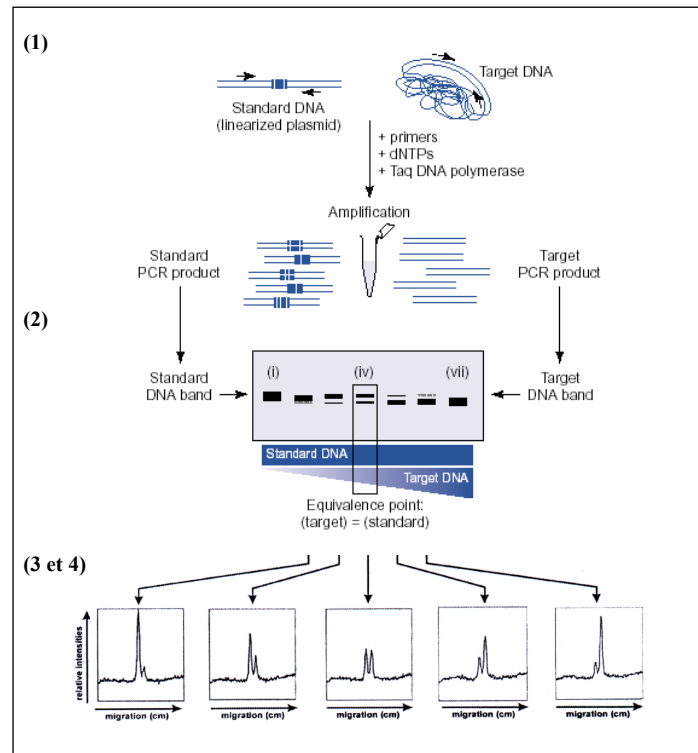


Figure II.16. Illustration du principe de la PCR compétitive quantitative (QC PCR) (d'après Hubner *et al.*, 1999)

La QC PCR consiste en 4 principales étapes :

- (1) coamplification dans un même tube de la séquence d'intérêt et de la séquence du standard interne. Différents tubes sont réalisés pour des quantités variables en ADN cible mais pour une quantité constante en standard interne,
- (2) restriction si nécessaire, puis séparation des produits PCR sur gel d'électrophorèse avec bromure d'éthidium,
- (3) analyse du gel avec un logiciel d'analyse d'image pour déterminer l'intensité des bandes,
- (4) détermination de la concentration initiale en cible : au point d'équivalence, les concentrations initiales de la séquence d'intérêt et du standard interne sont identiques.

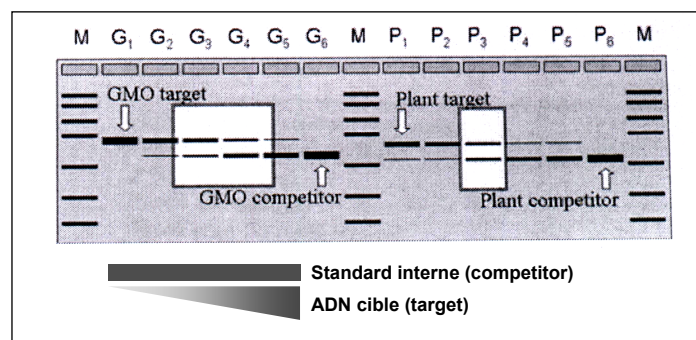


Figure II.17. Représentation des résultats obtenus avec la technique de double PCR compétitive (Holst-Jensen *et al.*, 2003)

Le principe appliqué au cas du RRS en est le suivant : pour estimer le pourcentage en transgène dans un échantillon test, il faut déterminer la quantité d'ADN initiale pour le RRS et pour un gène spécifique à la plante (la lectine dans le cas du soja), et faire le rapport des deux. Il suffit donc simplement de réaliser, en parallèle, deux PCR compétitives indépendantes, l'une visant le gène de la lectine, et l'autre, le transgène.

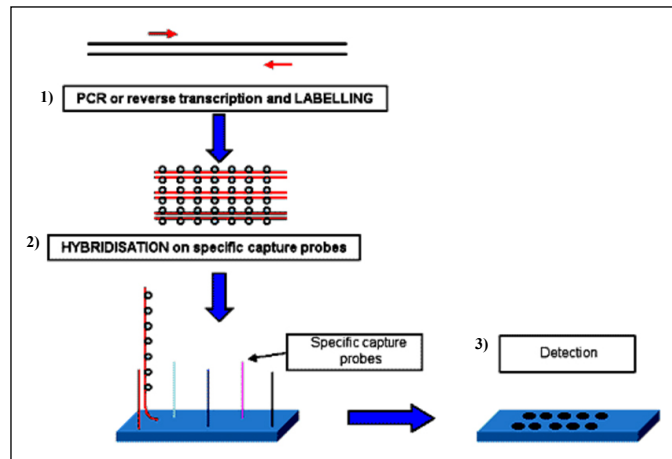


Figure III.18. Représentation schématique des principales étapes de l'hybridation sur damier (<http://www.eppendorf.com/eat/en/>)

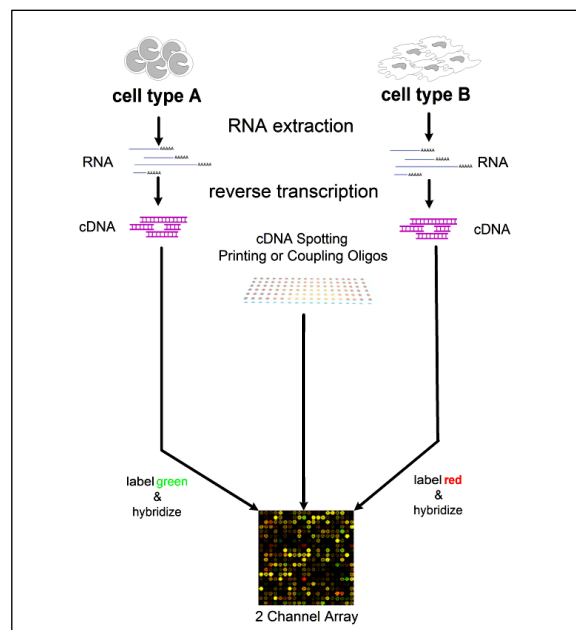


Figure III.19. Représentation des étapes successives lors de l'utilisation des Biochips dans le cadre d'études d'expression de gènes (<http://www.ncbi.nlm.gov/Class/NAWBIS/Modules/Expression/exp15.htm>)

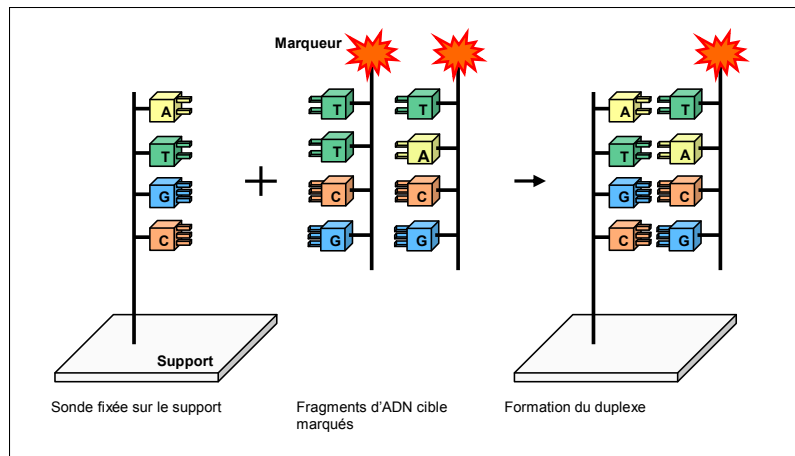


Figure III.20. Principe de l'hybridation sur damier

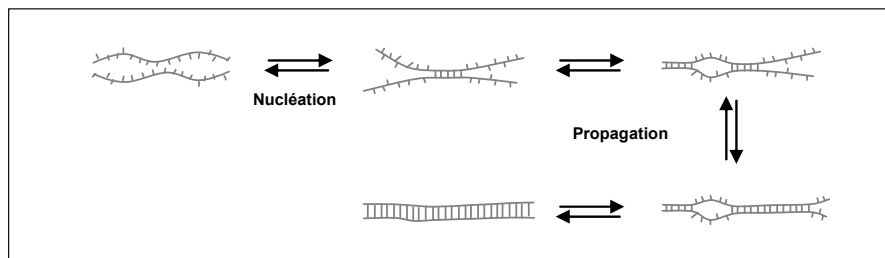


Figure III.21. Étapes de la réaction d'hybridation

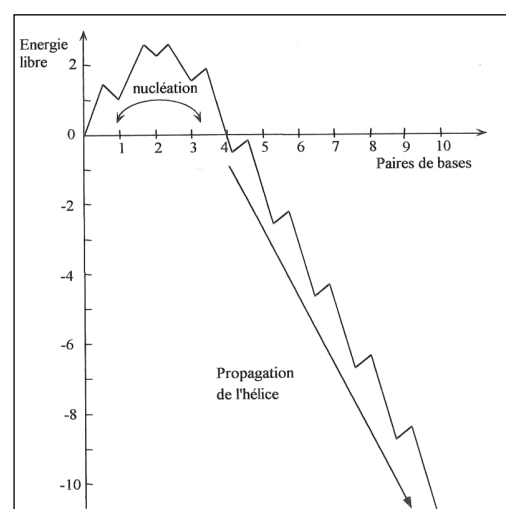


Figure III.22. Profil énergétique de la réaction d'hybridation (d'après Porschke, 1977)

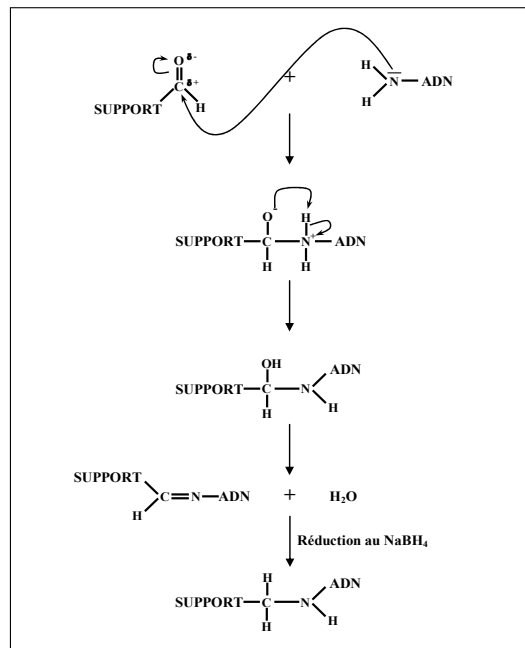


Figure III.23. Mécanisme de formation d'un lien covalent imine (ou base de Schiff) entre une fonction aldéhyde de la lame fonctionnalisée et la fonction amine liée à l'extrémité des ADN trappeurs et des contrôles. Puis réduction du lien imine en lien amine par un agent réducteur (NaBH_4 dans le cas présent).

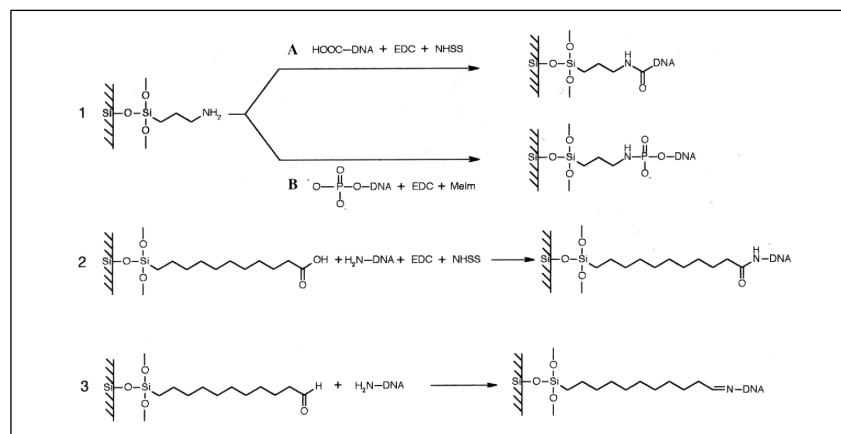


Figure III.24. Représentation de différents modes de liaison entre l'ADN et le support fonctionnalisé :
 1 : liaison d'un ADN carboxylé (A) ou phosphorylé (B) avec un groupement amine de la lame fonctionnalisée,
 2 : liaison d'un ADN aminé au niveau d'un groupement carboxyle du support,
 3 : liaison d'un ADN au niveau d'un groupement aldéhyde porté par la lame
 (Zammatteo *et al.*, 2000).

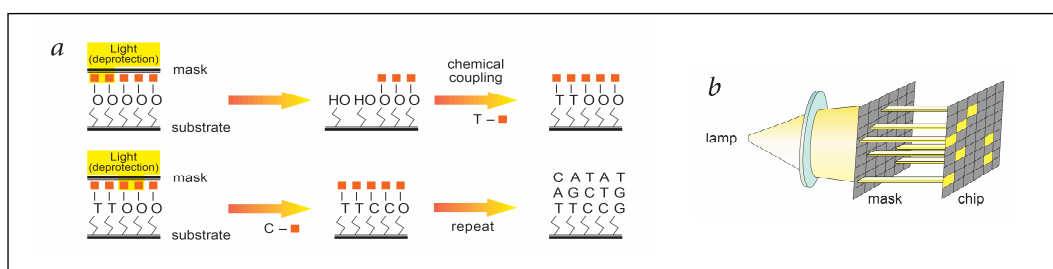


Figure III.25. a : Principe de synthèse in situ par photolithographie ;
 b : Représentation schématique de la lampe, du masque et du support
 (Lipshutz *et al.*, 1999)

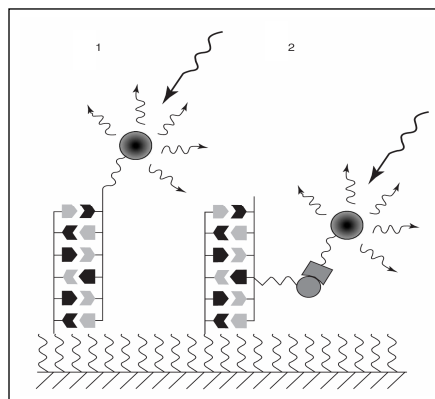


Figure III.26. Principe de marquage direct (1) et indirect (2) des cibles d'ADN avec un fluorophore (Foultier *et al.*, 2005)

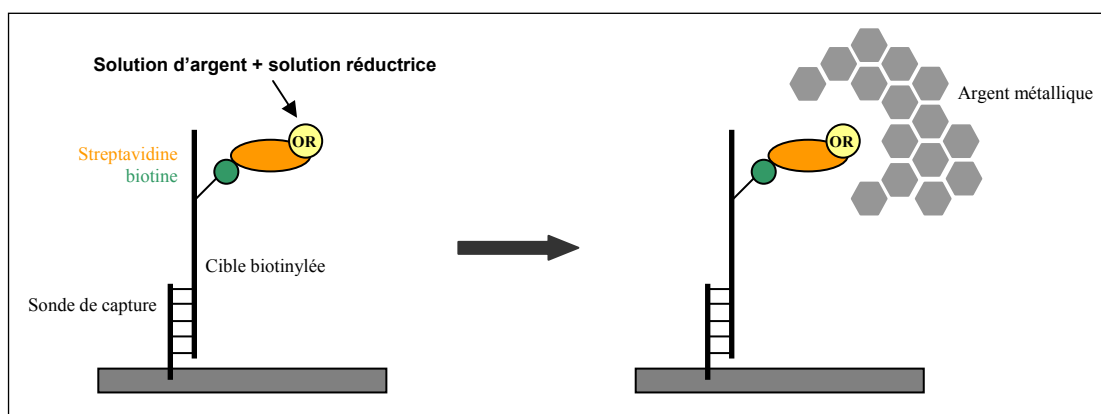


Figure III.27. Représentation schématique de la méthode de détection colorimétrique à l'argent (d'après Alexandre *et al.*, 2001)

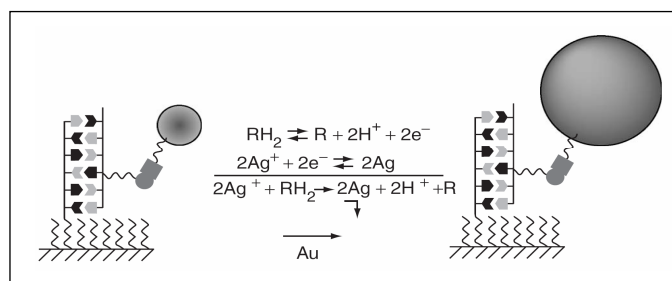


Figure III.28. Principe d'amplification du signal de la particule d'or par précipitation à l'argent (Foultier *et al.*, 2005)

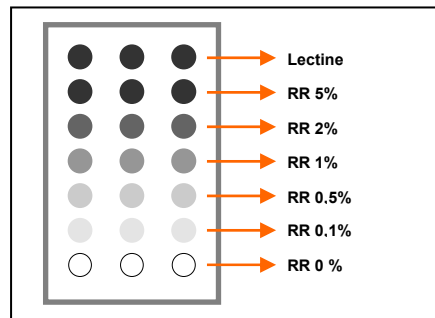


Figure IV.29. Principe théorique de la quantification sur biochips : la quantité de cible est corrélée à l'intensité des spots

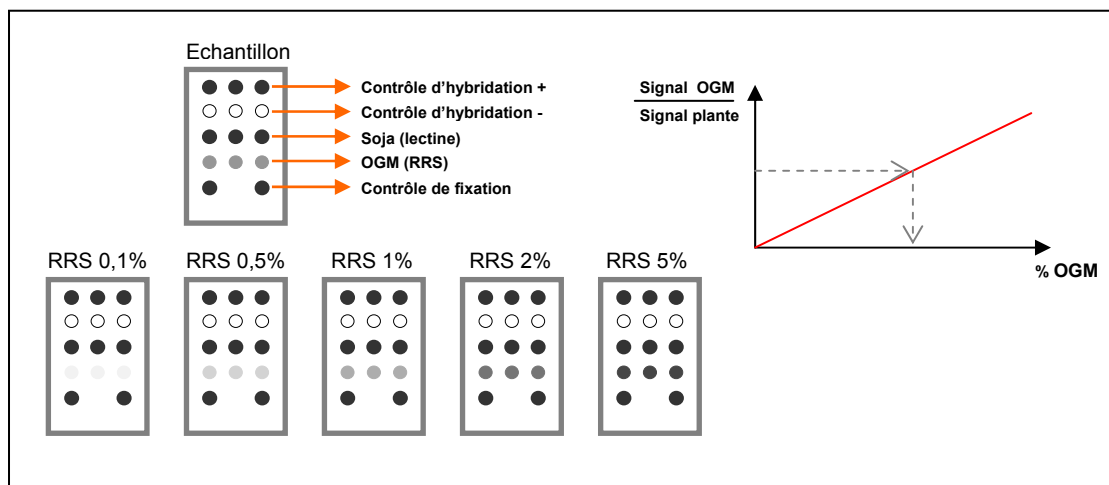


Figure IV.30. Principe de la quantification sur base de farine de référence : la teneur en OGM de l'échantillon est déterminée sur base de la droite de calibration dressée à l'aide des différentes farines.

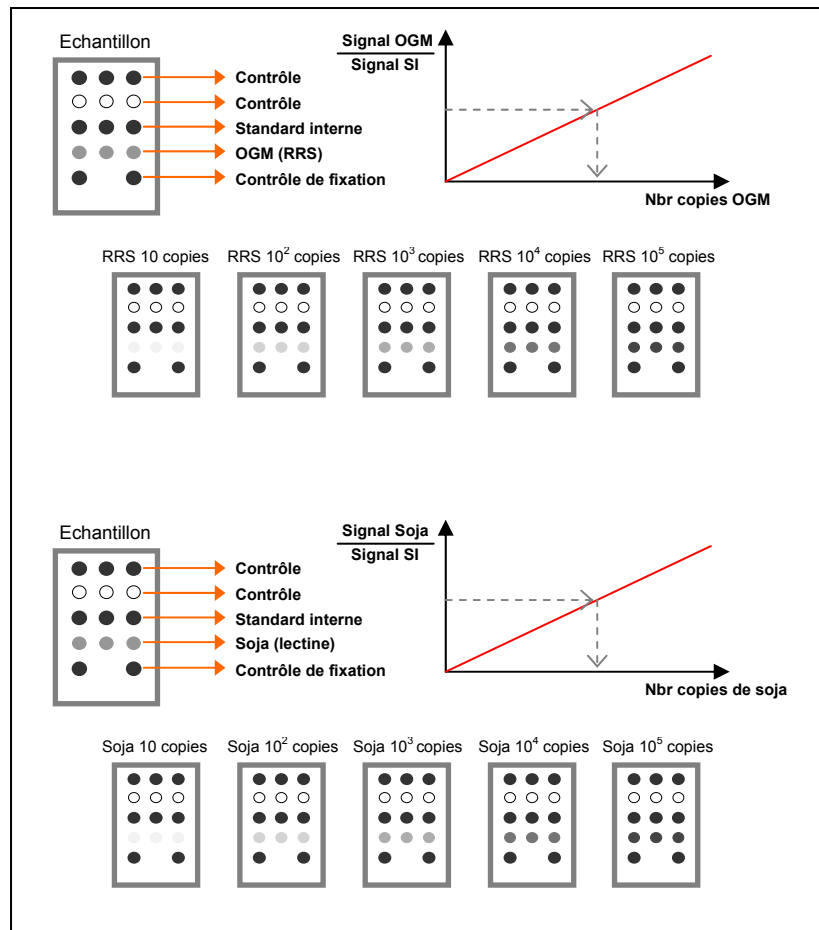


Figure IV.31. Principe de la quantification par PCR compétitive avec un standard interne : la teneur en OGM de l'échantillon est mesurée en réalisant le rapport nombre de copies d'OGM/nombre de copies de soja, ces deux derniers paramètres étant calculés indépendamment sur base de 2 droites de calibration.

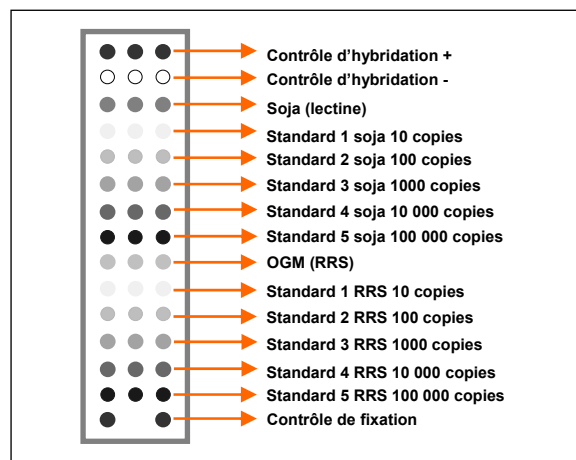


Figure IV.32. Complexification du modèle de quantification par PCR compétitive.

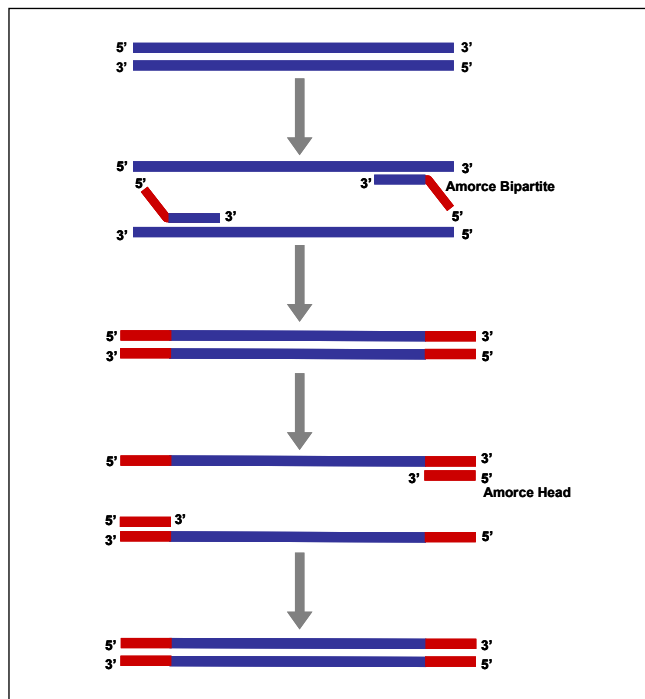


Figure 1. Représentation schématique du principe d'amplification réalisé à l'aide des amorces 'Bipartites', dans un premier temps, et de l'amorce Head, dans un deuxième temps. Cette subtilité est à la base du développement de la méthode de quantification par PCR compétitive

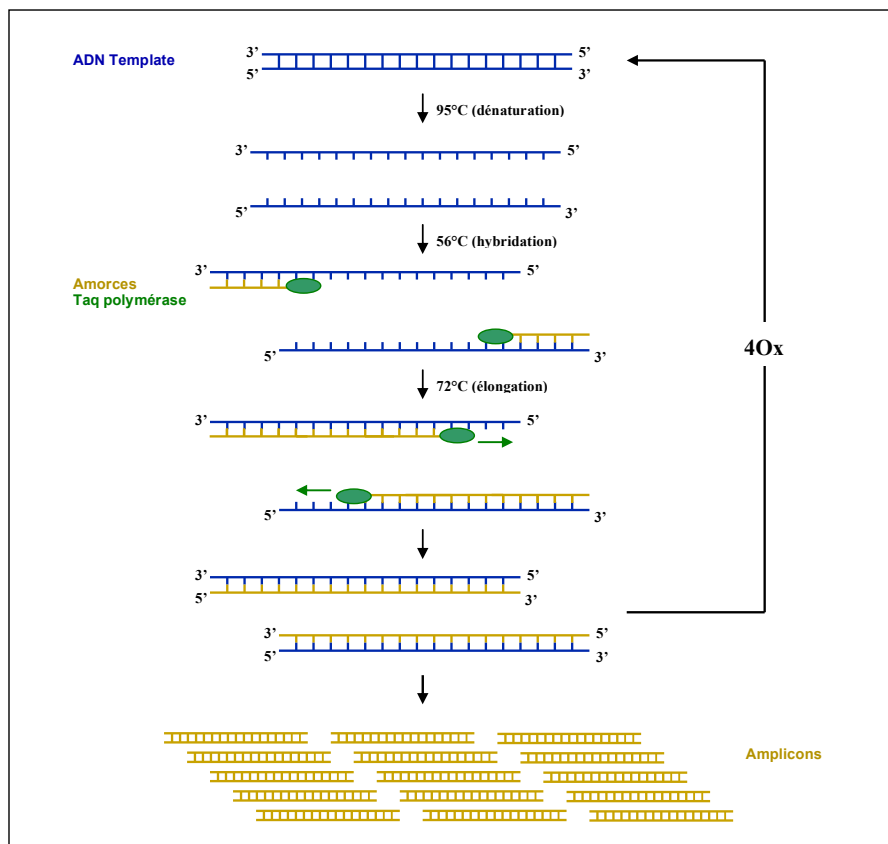


Figure I.1. Représentation schématique des principales étapes de l'amplification d'ADN par PCR



Figure I.2. Observation au microscope électronique à balayage de bactéries *Thermus Aquaticus* (<http://sci.agr.ca>) L'utilisation d'une enzyme thermostable, la Taq polymérase isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* a permis une semi-automatisation du processus d'amplification. Il s'agit d'une bactérie Gram-négative, aérobie et hétérotrophe, vivant à une température de 50 à 80°C

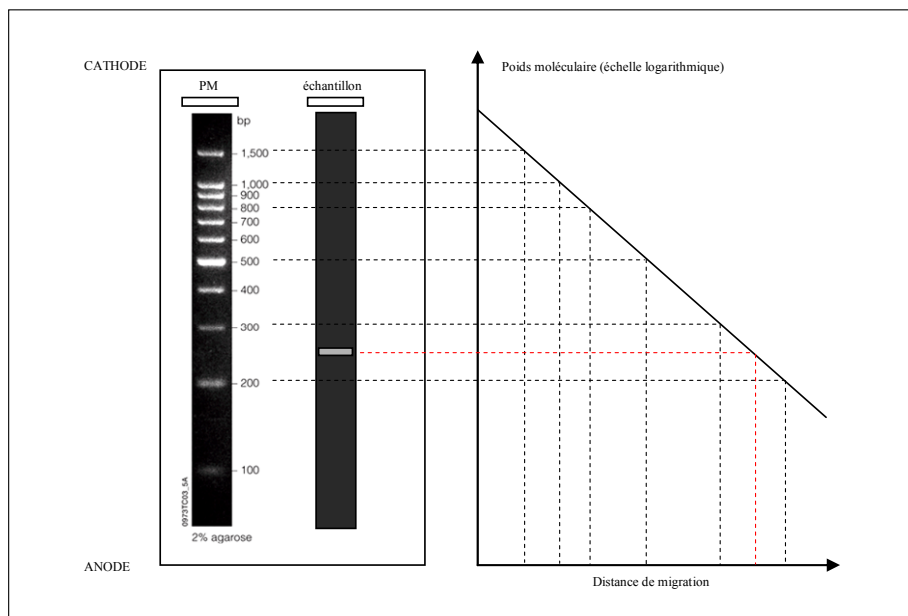


Figure II.3. Illustration d'une électrophorèse en gel d'agarose après migration et coloration au bromure d'éthidium

De gauche à droite : un marqueur de poids moléculaire Promega (10 fragments allant de 100bp à 1000bp avec un incrément de 100bp et un fragment supplémentaire de 1500bp), un échantillon dont la taille est à déterminer, courbe d'étalonnage donnant la taille des fragments en fonction de la distance de migration par rapport au puits de chargement

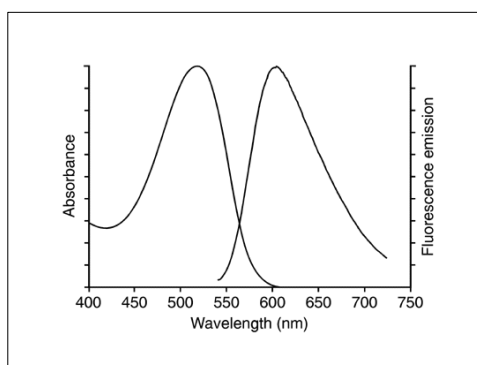
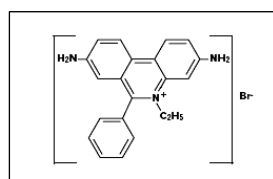


Figure II.4 et II.5. Formule moléculaire du bromure d'éthidium (Bromure de 3,8-diamino-1-éthyl-6-Phénylphénanthridinium) et ses caractéristiques spectrales

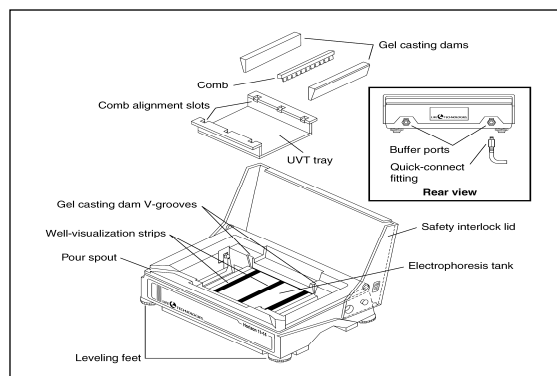


Figure II.6. Cuve d'électrophorèse horizon 11.14 (Gibco Brl, USA)

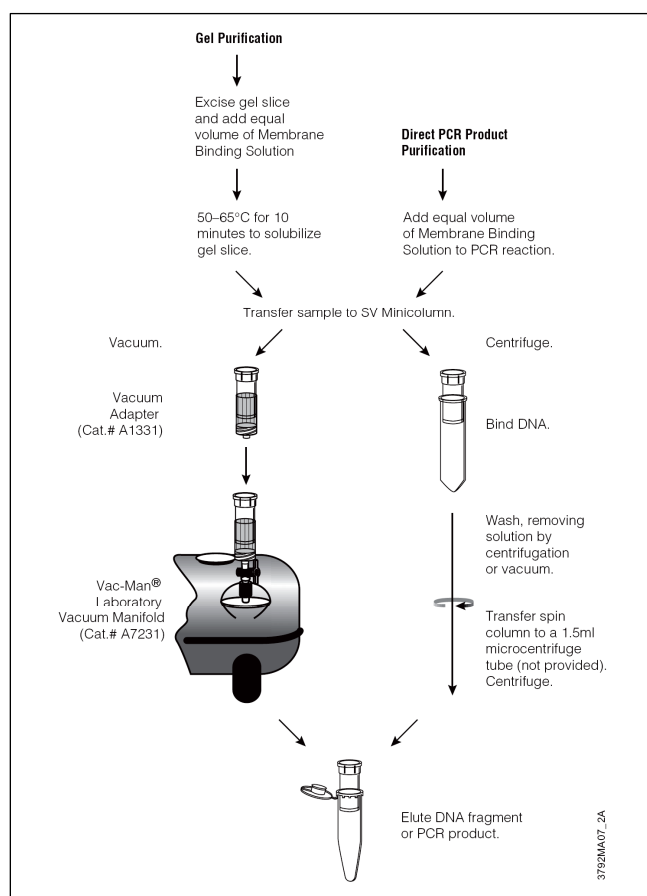


Figure III.7. Principe de purification d'ADN grâce au kit d'extraction Wizard SV gel and PCR clean-up system de Promega

Taille des fragments d'ADN	Pourcentage de récupération
55bp	26%
70bp	39%
85bp	55%
100bp	84%
500bp	89%
1000bp	92%
3199bp	95%
9416bp	95%
23130bp	47%

Table III.1. Pourcentage de récupération en fonction de la taille des fragments d'ADN double brin (Selon Promega)

Nom	Concentrations
Contrôle de fixation	40nM
Contrôle d'hybridation + (C ₂ B ₂)	3μM
Contrôle d'hybridation – (NF-κB)	3μM
Trappeurs	750nM

Table IV.2. Concentrations intermédiaires à préparer pour les différentes solutions à ‘spotter’

Préparation des solutions de lavage, rinçage et autres tampons		
Tampon de lavage (WB1)		Remarques
Unibuffer, B1 4x	6,25 ml	
Tween 20 100%	0,25 ml	
H ₂ O	244 ml	
Volume final	250 ml	
Tampon de rinçage		
Silverquant buffer 1x	2 ml	
H ₂ O	18 ml	
Volume final	20 ml	
Tampon de pré-blocage		
Agent bloquant	200 mg	Mixer jusqu'à dissolution complète de l'agent bloquant
Unibuffer, B1 4x	5 ml	
H ₂ O	15 ml	
Volume final	+/- 20 ml	
Tampon du conjugué		
Agent bloquant	200 mg	Mixer jusqu'à dissolution complète de l'agent bloquant
Unibuffer, B1 4x	5 ml	
H ₂ O	15 ml	
	+/- 20 ml	

Table V.3. Préparation des différentes solutions utilisées au cours de l'hybridation

Préparation des tampons et solutions		
		REMARQUES Ajuster à pH8 à l'aide d'HCl ou de NaOH
Tampon d'extraction CTAB (pH8)		
CTAB	20g/l	
NaCl	1,4mol/l	
Tris	1,4mol/l	
Na ₂ -EDTA	0,020 mol/l	
Tampon de précipitation CTAB (pH8)		
CTAB	5g/l	
NaCl	0,04mol/l	
Solution de phénol/chloroforme et isoamylalcool		
25 parts de phénol 24 parts de chloroforme 1 part d'isoamylalcool		
Solution de chloroforme/alcool isoamylique		
24 parts de chloroforme 1 part d'alcool isoamylique		
Solution de chloroforme		
Solution d'acétate de potassium		
Solution de phénol		
Solution d'éthanol		
Solution de chlorure de sodium		
Solution TE		
Tris	0,01 mol/l	
Na ₂ -EDTA	0,001 mol/l	

Table VI.4. Préparation des différentes solutions et tampons utilisés pour l'extraction d'ADN

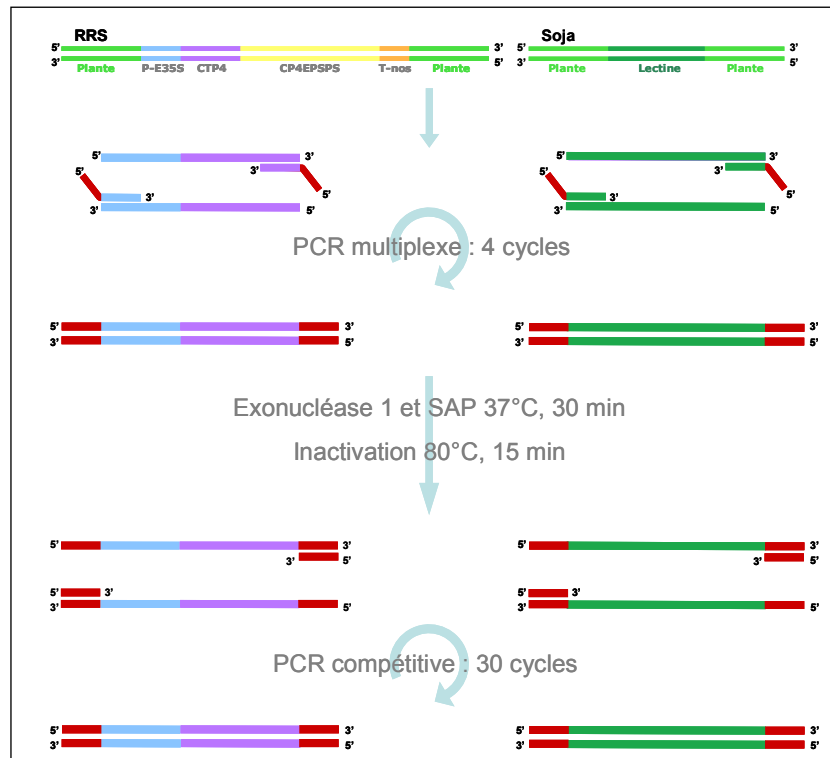


Figure 1. Principe de la PCR compétitive quantitative décrite par Rudi et associés et adaptée au cas du soja transgénique Roundup Ready (SAP = shrimp alkaline phosphatase)

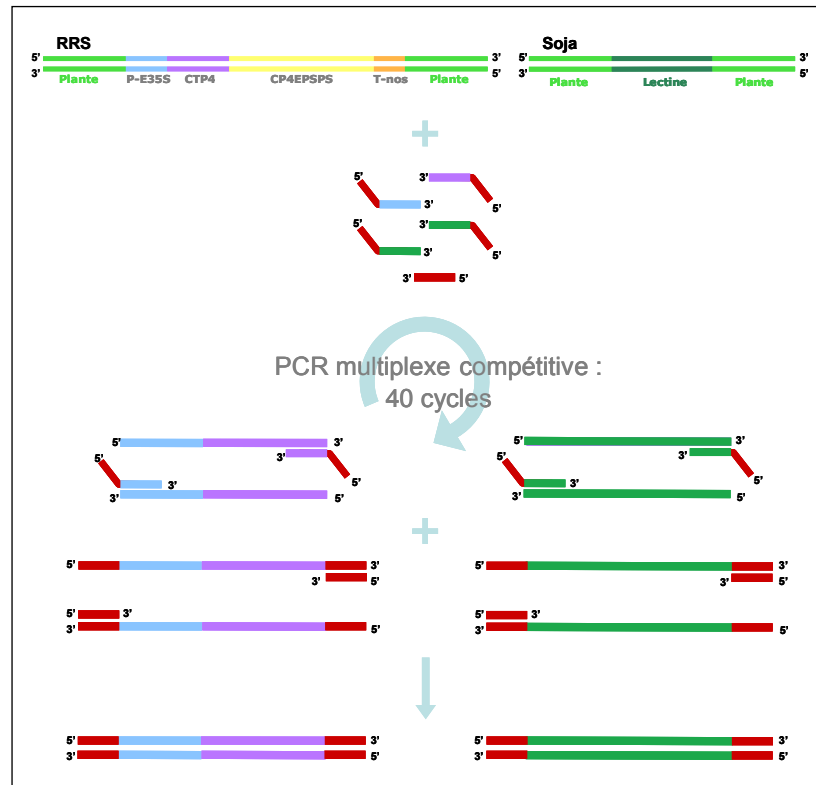


Figure 12. Principe de la nouvelle approche de PCR compétitive quantitative adaptée au cas particulier du soja transgénique Roundup Ready

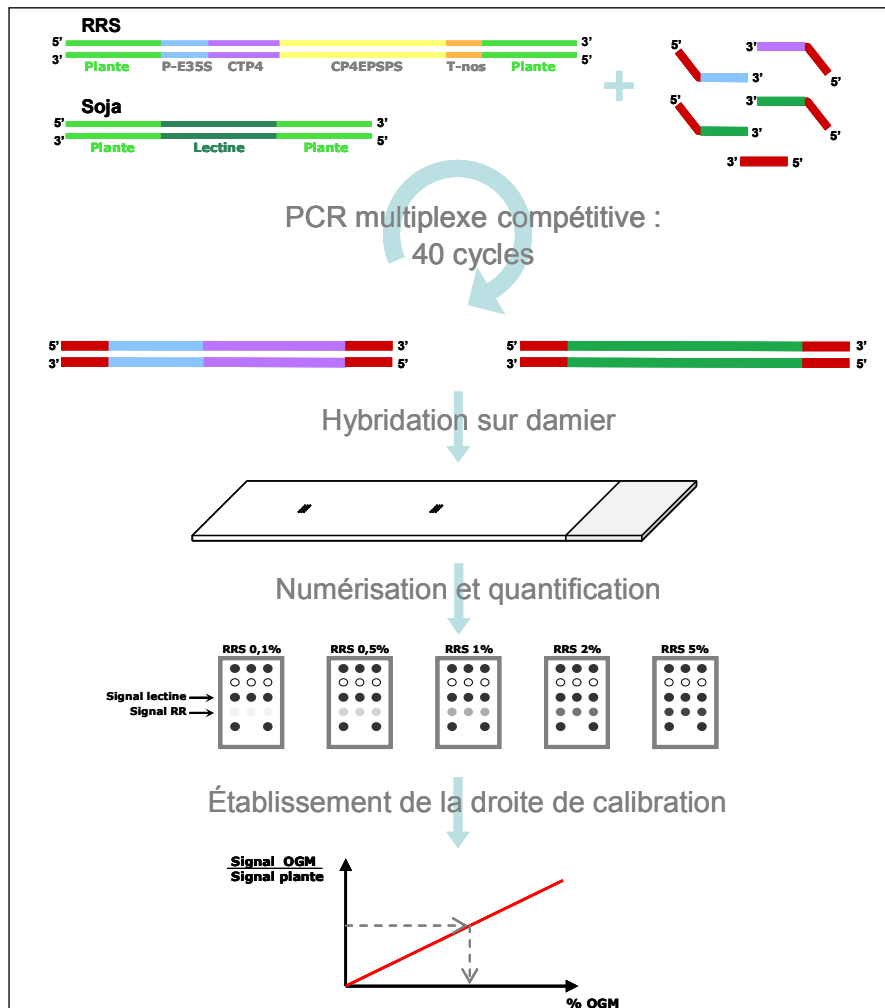


Figure 15. Représentation schématique des principales étapes permettant la mise au point d'une droite de calibration. Celle-ci exprime le pourcentage en OGM par rapport des signaux obtenu sur Biochips pour le RR et pour la lectine